



Disección de los circuitos espinales subyacentes al dolor
inflamatorio: conectividad neuronal y participación del canal
iónico TRPA1

Tesis doctoral presentada por

Pablo Hernández Ortego

Directora de Tesis:

Dra. Ana Gomis García

Co-director de Tesis:

Dr. Félix Viana de la Iglesia

Programa de Doctorado en Neurociencias

Instituto de Neurociencias - Universidad Miguel Hernández de Elche-CSIC

- 2025 -





TESIS DOCTORAL POR FORMATO CONVENCIONAL

La presente Tesis Doctoral, titulada “Disección de los circuitos espinales subyacentes al dolor inflamatorio: conectividad neuronal y participación del canal iónico TRPA1” se presenta bajo la modalidad de tesis convencional con el siguiente indicio de calidad:

- Hernández-Ortego, P.; Torres-Montero, R.; de la Peña, E.; Viana, F.; Fernández-Trillo, J. Validation of Six Commercial Antibodies for the Detection of Heterologous and Endogenous TRPM8 Ion Channel Expression. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 16164. doi: 10.3390/ijms232416164.





Sant Joan d'Alacant, 23 de enero 2025

La Dra. Dña. Ana Gomis García, directora, y el Dr. D. Félix Viana de la Iglesia, codirector de la tesis doctoral titulada “Disección de los circuitos espinales subyacentes al dolor inflamatorio: conectividad neuronal y participación del canal iónico TRPA1”

INFORMAN:

Que D. Pablo Hernández Ortego ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado “Disección de los circuitos espinales subyacentes al dolor inflamatorio: conectividad neuronal y participación del canal iónico TRPA1”, conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en Sant Joan d'Alacant a 23 de enero de 2025.

Directora de la tesis

Dra. Dña. Ana Gomis García

Codirector de la tesis

Dr. D. Félix Viana de la Iglesia



Sant Joan d'Alacant, 23 de enero 2025

Dra. Dña. Cruz Morenilla Palao, coordinadora del programa de Doctorado en Neurociencias del Instituto de Neurociencias de Alicante, centro mixto de la Universidad Miguel Hernández (UMH) y de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

INFORMA:

Que D. Pablo Hernández Ortego ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado “Disección de los circuitos espinales subyacentes al dolor inflamatorio: conectividad neuronal y participación del canal iónico TRPA1” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en Sant Joan d'Alacant a 23 de enero de 2025.

Dra. Dña. Cruz Morenilla Palao

Coordinadora del Programa de Doctorado en Neurociencias



La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por la Beca predoctoral FPI 2017 (REF: BES-2017-080782), los proyectos I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICIIN) SAF2016-77233-R y PID-2019-108194RB-100, la Generalitat Valenciana (PROMETEO/2021/031), el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y el Programa Severo Ochoa de Centros de Excelencia (SEV-2017-0723 y CEX2021-001165S).





ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	13
RESUMEN	16
ABSTRACT	18
1. INTRODUCCIÓN.....	21
1.1. El sistema nervioso periférico	23
1.1.1. Transducción sensorial: modalidades sensoriales y canales iónicos.....	25
1.1.2. Dolor y nocicepción	28
1.1.2.1. Nociceptores peptidérgicos y no peptidérgicos.....	30
1.1.2.2. Sensibilidad a calor y dolor térmico.....	31
1.1.3. Inflamación y dolor inflamatorio	33
1.1.3.1. El modelo inflamatorio del CFA	34
1.2. El canal iónico TRPA1	36
1.2.1. Estructura del canal TRPA1.....	36
1.2.2. Distribución del canal TRPA1	37
1.2.3. Agonistas del canal TRPA1.....	38
1.2.4. Papel de TRPA1 en la inflamación y sensibilización	38
1.3. La médula espinal.....	40
1.3.1. Estructura y organización	40
1.3.2. Subpoblaciones neuronales en el asta dorsal.....	41
1.3.2.1. Neuronas de proyección.....	42
1.3.2.2. Interneuronas	44
1.3.3. Funciones y adaptaciones de los circuitos espinales	48
1.4. Marcadores de actividad.....	51
1.4.1. Genes de expresión temprana.....	51
1.4.2. Sistemas reporteros basados en marcadores de actividad.....	52
2. OBJETIVOS	55
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
3.1. Animales.....	61
3.1.1. Línea transgénica TRPA1-Cre-ChR2	61
3.1.2. Línea transgénica TRAP2-tdTomato.....	62
3.2. Inducción del modelo inflamatorio y evaluación mediante test de conducta.....	63
3.2.1. Test de von Frey	63

3.2.2.	Test de Hargreaves	65
3.2.3.	Rampa de calor en la placa caliente	65
3.3.	Captura o marcaje permanente de circuitos	65
3.3.1.	Preparación y administración de 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT).....	65
3.3.2.	Estimulación y marcaje permanente de neuronas activas.....	66
3.4.	Registros electrofisiológicos en rodajas de médula espinal	67
3.4.1.	Clasificación de neuronas según el patrón de disparo de potenciales de acción	70
3.5.	Trazado retrógrado de terminales	70
3.5.1.	Aferentes del estómago.....	70
3.5.2.	Aferentes de la superficie plantar.....	71
3.6.	Aislamiento y cultivo de neuronas de los ganglios de la raíz dorsal y de los ganglios vagales	71
3.7.	Imagen de calcio intracelular mediante fluorescencia	73
3.8.	Estimulación optogenética.....	76
3.8.1.	Imagen de calcio intracelular durante estimulación óptica	76
3.8.2.	Electrofisiología en neuronas disociadas tras iluminación con luz pulsante.....	77
3.8.3.	Comportamiento nocifensivo	78
3.9.	Inmunohistoquímica	79
3.9.1.	Procesamiento de tejidos: ganglios raquídeos	79
3.9.2.	Procesamiento de tejidos: médula espinal	79
3.9.3.	Protocolo de inmunohistoquímica.....	80
3.10.	Adquisición y procesamiento de imágenes.....	81
3.11.	Soluciones, reactivos y compuestos.....	82
3.11.1.	Soluciones salinas.....	82
3.11.2.	Compuestos usados en experimentos de imagen de calcio	83
3.11.3.	Anticuerpos utilizados	83
3.12.	Representación de los datos y estadística	84
4.	RESULTADOS	86
BLOQUE I: CARACTERIZACIÓN DE LAS NEURONAS SENSORIALES QUE EXPRESAN TRPA1, SU ACTIVACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE OPTOGENÉTICA Y LA IDENTIFICACIÓN DE SUS DIANAS EN LA MÉDULA ESPINAL		88
4.1.	Identificación de terminales TRPA1 ⁺ que inervan la superficie plantar	88
4.1.1.	Trazado de la inervación cutánea de la superficie plantar.....	88
4.1.2.	Caracterización funcional del canal TRPA1 en neuronas sensoriales aferentes plantares y comparación con aferentes viscerales	89
4.2.	Estimulación selectiva de fibras TRPA1 ⁺ mediante técnicas de optogenética	92

4.2.1.	Caracterización funcional de la línea de ratón transgénico TRPA1-ChR2-EYFP mediante imagen de calcio.....	92
4.2.2.	Registro de corrientes de acción generadas por estimulación con luz en neuronas TRPA1+/ChR2-EYFP+.....	94
4.2.3.	Estudio de las respuestas conductuales provocadas por la estimulación por luz de las terminaciones TRPA1 ⁺ en la superficie plantar del ratón TRPA1-ChR2-EYFP.....	97
4.3.	Caracterización molecular y conectividad en la médula espinal de las neuronas sensoriales TRPA1 ⁺	99
4.3.1.	Clasificación de las neuronas TRPA1 ⁺ /ChR2-EYFP ⁺ como nociceptores peptidérgicos o no peptidérgicos	99
4.3.2.	Proyecciones de las neuronas TRPA1 ⁺ , su entrada en médula y conexiones con neuronas espinales	102
BLOQUE II: CARACTERIZACIÓN DE LOS CIRCUITOS INVOLUCRADOS EN LA TRANSMISIÓN DE INFORMACIÓN NOCIVA TÉRMICA EN CONTEXTO AGUDO E INFLAMATORIO		106
4.4.	Desarrollo y caracterización del modelo inflamatorio: modelo del CFA.....	106
4.4.1.	Evaluación de la sensibilidad mecánica y térmica en el modelo CFA.....	106
4.5.	Estudio de la activación de cFos en médula espinal tras la estimulación nociva térmica	109
4.5.1.	Identificación del umbral nocivo térmico.	109
4.5.2.	Expresión de cFos en el asta dorsal de la médula espinal en diferentes condiciones de estimulación con calor nocivo	110
4.6.	Marcaje permanente de circuitos activados por calor en médula espinal: el ratón TRAP2	113
4.6.1.	Validación del ratón TRAP2.....	113
4.6.2.	“ATRAPamiento” de circuitos activados por calor en condiciones control y comparación con marcaje cFos. Reactivación de poblaciones.	116
4.6.3.	Comparación de la población activada por calor en condiciones fisiológicas e inflamatorias.....	119
4.6.4.	“ATRAPamiento” de circuitos activados por calor en condiciones inflamatorias y comparación con marcaje cFos. Reactivación de poblaciones.	121
4.6.5.	Reactivación de poblaciones neuronales sensibles a estímulos nocivos tras la aplicación de un segundo estímulo inocuo en un contexto inflamatorio	123
4.7.	Caracterización funcional de las poblaciones de interneuronas espinales activadas por estímulos térmicos.....	125
4.7.1.	Modificaciones funcionales en médula espinal inducidas por la inflamación con CFA	125
4.7.2.	Caracterización funcional de las neuronas tdTomato ⁺ y tdTomato ⁻ en condiciones control e inflamatorias.....	131
5.	DISCUSIÓN.....	137
5.1.	Las fibras TRPA1 ⁺ inervan tanto la piel como los órganos internos	139

5.2. El ratón TRPA1-ChR2-EYFP como herramienta para el estudio de la población de neuronas sensoriales TRPA1 ⁺	142
5.2.1. La recombinación en el ratón TRPA1-Cre presenta baja eficiencia, pero alta selectividad	143
5.2.2. La activación de los canales activados con luz no pudo observarse mediante técnicas de imagen de calcio pero sí mediante técnicas electrofisiológicas.....	144
5.2.3. La aplicación de pulsos de luz <i>in vivo</i> evoca en los ratones comportamientos similares a los provocados por la activación con agonistas de TRPA1	145
5.2.4. Las neuronas TRPA1+ marcadas en el ratón TRPA1-ChR2-EYFP pertenecen mayoritariamente a la subpoblación de nociceptores no peptidérgicos	147
5.2.5. Los terminales centrales de las neuronas sensoriales TRPA1 ⁺ se proyectan a las láminas superficiales del asta dorsal de la médula espinal, y su activación induce expresión de cFos en neuronas de segundo orden	148
5.3. El modelo del CFA como paradigma de la inflamación	152
5.4. cFos como marcador de actividad neuronal en la médula espinal	152
5.5. El ratón TRAP2: imagen fija de la actividad neuronal	153
5.5.1. Inestabilidad de los circuitos neuronales de la médula espinal dorsal	156
5.5.1.1. Resultados en condiciones fisiológicas	156
5.5.1.2. Resultados en condiciones de inflamación	158
5.5.1.3. Resultados tras estímulos térmicos de diferente intensidad	159
5.5.2. Caracterización funcional de las neuronas espinales sensibles a calor y sus adaptaciones en contextos inflamatorios.....	160
5.5.2.1. Modificaciones funcionales tras la inflamación inducida por CFA	160
5.5.2.2. Identidad funcional de la población de neuronas espinales sensibles a calor	162
6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	165
7. BIBLIOGRAFÍA.....	170
8. ANEXO: PUBLICACIÓN	207
AGRADECIMIENTOS.....	229



ABREVIATURAS

4OHT: 4-hidroxi-tamoxifeno

ACSF: líquido cefalorraquídeo artificial

AITC: alil isotiocianato

Caps: capsaicina

CFA: adyuvante completo de Freund

ChR2: canalrodopsina-2

Contra: contralateral a la inyección o estimulación

CR: calretinina

Cre: recombinasa (“Causes recombination”)

Dil: dioctadecil-3,3',3',3'-tetrametilindocarbocianinperclorato

DRG: ganglio raquídeo

EYFP: proteína amarilla fluorescente “mejorada”

F340: fluorescencia emitida por el Fura-2 excitado con luz de longitud de onda de 340 nm

F380: fluorescencia emitida por el Fura-2 excitado con luz de longitud de onda de 380 nm

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GFAP: proteína ácida fibrilar glial

IB4: isolectina B4, marcador de nociceptores no peptidérgicos

Iba1: molécula adaptadora de la unión de calcio ionizado 1

i.p.: intraperitoneal

i.pl.: intraplantar

Ipsi: ipsilateral a la inyección o estimulación

KCl: cloruro potásico

Kv: canales de potasio dependientes de voltaje

LI, LII, LIII: lámina de Rexed I, II, III

LPB: núcleo parabraquial lateral

MrgprD: receptor D asociado a la proteína G relacionada con Mas

Nav: canales de sodio dependientes de voltaje

Niveles medulares C, T, L, S: cervical, torácico, lumbar y sacro

NK1R: receptor 1 de neuroquinina
NNOS: óxido nítrico sintasa neuronal
NPY: neuropéptido Y
PFA: paraformaldehído
PKC γ : proteína quinasa C isoforma gamma
PV: parvalbúmina
RMP: potencial de membrana en reposo
SEM: error estándar de la media
sEPSC: corriente excitatoria postsináptica
SNC: sistema nervioso central
SNP: sistema nervioso periférico
SOM: somatostatina
SP: sustancia P
SS: solución salina
TRAP: recombinación dirigida en poblaciones activas
TRP: canales iónicos de potencial transitorio
VG: ganglio vagal
vGLUT2: transportador de glutamato vesicular 2
WDR: amplio rango dinámico
WGA: aglutinina de germen de trigo



RESUMEN

El canal iónico TRPA1 es un canal catiónico no selectivo presente en varios tejidos, donde desempeña la función de sensor de estrés celular y daño tisular debido a su capacidad para detectar una plétora de señales de daño e irritantes ambientales. En el sistema somatosensorial, el canal se expresa en una subpoblación de neuronas sensoriales nociceptivas. Tanto la sensibilidad de TRPA1 a mediadores inflamatorios como su localización en los nociceptores, le confieren un papel central en la patogénesis de una gran variedad de síndromes inflamatorios, especialmente en el desarrollo de la hipersensibilidad característica de estos modelos. Sin embargo, la población que expresa TRPA1 no se ha logrado clasificar de manera inequívoca como perteneciente a uno de los dos grupos de nociceptores, peptidérgicos y no peptidérgicos, y tampoco se conoce la población de neuronas sensoriales de segundo orden con la que estas fibras hacen sinapsis en el asta dorsal de la médula espinal, lo que limita sustancialmente las posibilidades terapéuticas cuando se abordan estas patologías.

Por otro lado, los procesos inflamatorios, además de ocasionar cambios fenotípicos en los nociceptores, entre los que se encuentran las neuronas sensoriales TRPA1⁺, también provocan modificaciones funcionales en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal, que implican un aumento de la sensibilidad a los estímulos. En estas capas medulares se localizan distintas subpoblaciones de neuronas, y su conectividad y organización en circuitos determina cómo se procesan y amplifican las señales nociceptivas. No obstante, la diversidad de poblaciones neuronales y la plasticidad de las conexiones que éstas establecen, complica la caracterización de circuitos involucrados en modalidades sensoriales concretas.

El primer objetivo de esta tesis doctoral ha sido estudiar la población de neuronas sensoriales TRPA1⁺, su distribución, la expresión de marcadores de nociceptores en estas neuronas y el efecto que tiene su activación selectiva en la conducta de los ratones. Para ello, se utilizó una línea de ratón transgénico, el ratón TRPA1-Cre cruzado con el reportero ChR2-EYFP, en el que la expresión de la proteína fluorescente permitió la identificación de estas neuronas, y la canalrodopsina, su activación con luz. Se pudieron identificar neuronas TRPA1⁺ tanto en ganglios raquídeos (DRG), que inervan la superficie corporal, así como en neuronas que inervan vísceras como el estómago, que pertenecen fundamentalmente a la población de nociceptores no peptidérgicos y que hacen sinapsis con neuronas de segundo orden en las láminas superficiales de la médula espinal. Además, su activación con luz evocó

comportamientos de retirada, retracción y especialmente de lamida, lo que confirma su identidad nociceptiva.

El segundo objetivo ha sido caracterizar los circuitos de la médula espinal dorsal implicados en la transmisión de un estímulo nocivo en situaciones de dolor inflamatorio y examinar si estos circuitos se reactivan después de un estímulo inocuo en un contexto inflamatorio. Para ello, la herramienta utilizada ha sido la línea de ratón transgénico TRAP2-tdTomato, con el que se ha podido marcar permanente la población neuronal que se activa tras la aplicación de un estímulo de calor nocivo, tanto en condiciones control cómo de inflamación. Su análisis demostró que los circuitos espinales que integran la información nociceptiva no son estables en el tiempo, que la inflamación induce un aumento en el input glutamatérgico de las neuronas espinales y que las neuronas que integran la información nociceptiva térmica disparan de manera predominante potenciales de acción con un patrón tónico.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las neuronas TRPA1⁺ constituyen mayoritariamente una población de nociceptores no peptidérgicos cuya activación induce respuestas aversivas, y que las neuronas espinales de segundo orden integran la información nociceptiva en circuitos plásticos cuya actividad espontánea aumenta durante los procesos inflamatorios. Estos descubrimientos contribuyen a comprender mejor la naturaleza de estos procesos, abriendo la puerta a desarrollar terapias más efectivas que mejoren la calidad de vida de pacientes que padecen este tipo de síndromes.

ABSTRACT

The TRPA1 ion channel is a non-selective cation channel present in various tissues, where it functions as a sensor of cellular stress and tissue damage due to its ability to detect a plethora of damage signals and environmental irritants. In the somatosensory system, the channel is expressed in a subpopulation of nociceptive sensory neurons. TRPA1's sensitivity to inflammatory mediators, along with its localization in nociceptors, gives it a central role in the pathogenesis of a wide range of inflammatory syndromes, particularly in the development of the hypersensitivity of these models. However, the population expressing TRPA1 has not been unequivocally classified as part of the two nociceptor groups, peptidergic and non-peptidergic, and the population of second-order sensory neurons with which these fibers synapse in the dorsal horn of the spinal cord is also unknown, substantially limiting therapeutic possibilities when addressing these pathologies.

On the other hand, inflammatory processes, in addition to causing phenotypic changes in nociceptors, including TRPA1⁺ sensory neurons, also induce functional modifications in dorsal horn neurons in the spinal cord, leading to increased sensitivity to stimuli. These spinal layers contain different neuronal subpopulations, and their connectivity and organization into circuits determine how nociceptive signals are processed and amplified. However, the diversity of neuronal populations and the plasticity of the connections they establish complicate the characterization of circuits involved in specific sensory modalities.

The first objective of this doctoral thesis was to study the population of TRPA1⁺ sensory neurons, their distribution, the expression of nociceptor markers in these neurons, and the effect of their selective activation on mouse behavior. To this end, a transgenic mouse line was used, TRPA1-Cre crossed with the ChR2-EYFP reporter, in which the expression of the fluorescent protein allowed the identification of these neurons, and channelrhodopsin enabled their activation with light. TRPA1⁺ neurons were identified in the dorsal root ganglia (DRG), innervating the body surface, as well as in neurons innervating viscera such as the stomach. These mainly belong to the non-peptidergic nociceptor population and synapse with second-order neurons in the superficial laminae of the spinal cord. Furthermore, their activation by light evoked withdrawal, lifting, and especially licking behaviors, confirming their nociceptive identity.

The second objective was to characterize the circuits in the dorsal spinal cord involved in transmitting a noxious stimulus during inflammatory pain and to examine whether these circuits

are reactivated after an innocuous stimulus in an inflammatory context. For this, the tool used was the transgenic TRAP2-tdTomato mouse line, which allowed for the permanent labeling of the neuronal population activated after the application of a noxious heat stimulus, both in control and inflammatory conditions. Analysis demonstrated that the spinal circuits integrating nociceptive information are not stable over time, that inflammation induces an increase in the glutamatergic input to spinal neurons, and that the neurons integrating thermal nociceptive information predominantly fire action potentials with a tonic pattern.

In conclusion, the results obtained in this work demonstrate that TRPA1⁺ neurons constitute a predominantly non-peptidergic nociceptor population whose activation induces aversive responses, and that second-order spinal neurons integrate nociceptive information in plastic circuits, whose spontaneous activity increases during inflammatory processes. These discoveries contribute to a better understanding of the nature of these processes, opening the door to the development of more effective therapies to improve the quality of life of patients suffering from these syndromes.







1. INTRODUCCIÓN



1.1. El sistema nervioso periférico

La capacidad para percibir tanto las señales de nuestro entorno como los cambios que ocurren en el interior de nuestro organismo, así como de responder adecuadamente a ellos, es fundamental para la supervivencia de cualquier ser vivo. Estas funciones son desempeñadas por el sistema nervioso periférico (SNP), que conecta músculos y órganos de la superficie y el interior del cuerpo con circuitos de procesamiento en el sistema nervioso central (SNC). Dentro del SNP, la división aferente o sensorial transmite información desde los receptores sensoriales hacia el SNC, al tiempo que la división eferente o motora conecta el encéfalo y la médula espinal con los músculos efectores (Purves et al. 2018).

Ya en 1906, el neurofisiólogo inglés Charles Sherrington clasificó la porción aferente o sensorial del SNP en tres amplias categorías: propioceptiva, que permite identificar la posición de nuestro cuerpo en el espacio, el equilibrio y el movimiento; exteroceptiva, que percibe la información acústica, visual, química, mecánica o térmica procedente del entorno; e interoceptiva, que detecta cambios en el estado de los órganos internos (Sherrington 1906). Clasificaciones más detalladas expanden los sistemas sensoriales, categorizándolos en visual, auditivo, vestibular, sentidos químicos, sistema sensorial somático y sistema sensorial visceral. Nos centraremos aquí en los dos últimos: el sistema somatosensorial, responsable de las sensaciones mecánicas, térmicas, propioceptivas y nocivas recogidas en la piel y los músculos, y el sistema sensorial visceral, responsable de monitorizar la actividad de los órganos internos (Haines y Mihailoff 2017).

Estos dos sistemas están conformados por neuronas sensoriales primarias, que son células pseudounipolares cuyo axón se bifurca en dos terminales: una que proyecta a la periferia, formando los nervios espinales y los craneales, y otra que proyecta al SNC. Los somas de estas neuronas se encuentran encapsulados en los ganglios raquídeos (DRG) y en los ganglios de los nervios craneales (Kandel et al. 2021) (Fig. 1).

Los DRG se sitúan adyacentes y a lo largo de la médula espinal, y contienen los somas de las neuronas somatosensoriales que inervan piel, músculos y articulaciones. En el humano existen 31 pares de DRG, mientras que en el ratón varían de 30 a 31 dependiendo de la cepa (Malin, Davis, y Molliver 2007). Cada DRG contiene los somas de todas las neuronas cuyos terminales periféricos conforman un nervio espinal, y cada nervio espinal inerva un área de piel o un músculo específico. Por ejemplo, en el ratón, los nervios originados en las neuronas de los DRG correspondientes a los niveles lumbares 3, 4 y en menor medida 5 confluyen para constituir el

nervio ciático, que después se ramifica para inervar diferentes porciones de la extremidad posterior (Rigaud et al. 2008). Los terminales centrales de estas neuronas hacen sinapsis en el asta dorsal de la médula espinal (Fig. 1.A).

De manera similar, los nervios craneales inervan porciones de la cara, la lengua o el cuello, así como los órganos internos. Las neuronas que forman parte del componente sensorial de estos nervios tienen sus somas en los ganglios trigeminales y vagales, y sus terminales centrales alcanzan el SNC a nivel del tronco del encéfalo. Este es el caso del nervio vago o X par craneal, cuya componente sensorial inerva prácticamente todas las vísceras, incluyendo las vías aéreas, el corazón, la vejiga, el hígado, el páncreas, el estómago y gran parte del intestino (Fig. 1.B). Aquí detectan estiramientos, cambios de temperatura, sustancias químicas o irritación, información que es interpretada en el cerebro como hambre, dolor, hinchazón o náuseas. Además de esa información consciente, las neuronas sensoriales viscerales establecen arcos reflejos para desencadenar respuestas autónomas que mantienen las funciones respiratorias, cardíacas e intestinales (Furness y Clerc 2000; Marieb 2019; Wang, de Lartigue, y Page 2020). En el ratón, los somas de estas neuronas se localizan en los ganglios vagales (VG), situados en la base del cráneo y adyacentes al canal yugular (Han y de Araujo 2021).



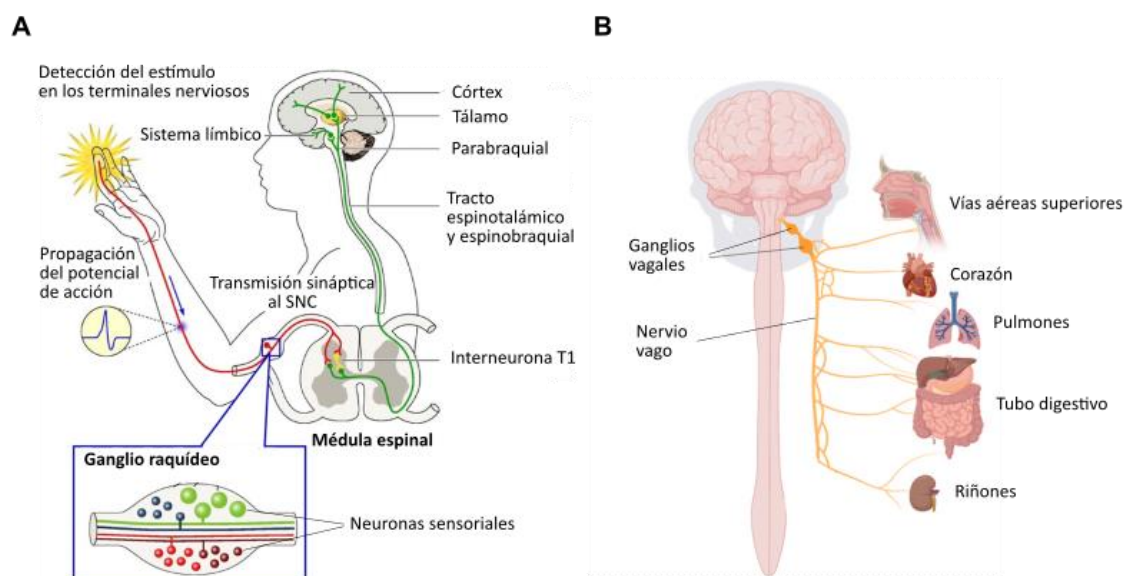


FIGURA 1. Organización de la división sensorial del SNP. (A): Las neuronas sensoriales detectan estímulos mecánicos, térmicos, propioceptivos y nocivos de la superficie corporal, y transducen esos estímulos en potenciales eléctricos o potenciales de acción. Estos potenciales se propagan hacia los somas de las neuronas sensoriales, localizados en los ganglios raquídeos, y continúan hasta integrarse en circuitos de interneuronas de la médula espinal, desde donde viajarán hasta centros superiores. Modificado de [Bourinet et al. 2014](#). (B): En el caso del sistema sensorial visceral, los somas de las neuronas sensoriales se localizan principalmente en los ganglios vagales, y sus terminales periféricas inervan vísceras como el corazón, los pulmones o el tubo digestivo. Los terminales centrales de estas neuronas hacen sinapsis en el núcleo del tracto solitario y el área postrema, situados en el tronco encefálico. Modificado de [Shaffer, Barrett, y Quigley 2023](#).

1.1.1. Transducción sensorial: modalidades sensoriales y canales iónicos

La detección de los estímulos por parte de las neuronas sensoriales primarias y su transformación en una señal bioeléctrica se conoce como transducción sensorial: la energía del estímulo altera la permeabilidad de los canales iónicos en las terminaciones aferentes y genera un potencial receptor, que puede llegar a alcanzar el umbral para el disparo de potenciales de acción. Estos potenciales de acción se transmiten a lo largo del axón de la neurona hacia el SNC, procesándose finalmente en el cerebro y generando una percepción (Fig. 2).

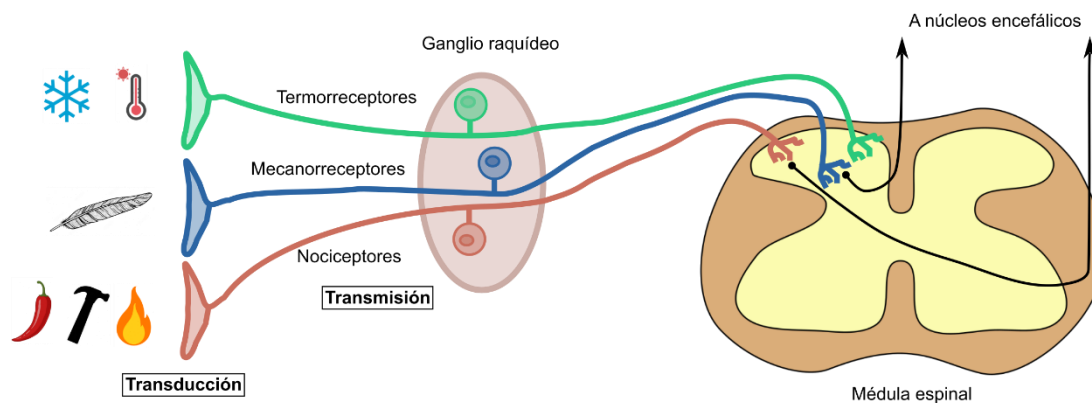


FIGURA 2. Representación esquemática de la organización del sistema nervioso periférico. Las neuronas sensoriales inervan la periferia y los órganos internos y expresan canales iónicos y moléculas sensibles a estímulos. En función de la dotación molecular, son capaces de detectar diferentes modalidades de estímulos, y se dividen consecuentemente en termorreceptores, mecanorreceptores y nociceptores. El proceso de conversión de la energía del estímulo en energía eléctrica se conoce como transducción sensorial. El impulso eléctrico se transmite a lo largo de la fibra hasta integrarse en el sistema nervioso central para ser transmitido a centros superiores.

El conjunto de moléculas receptoras presentes en la terminal determina la modalidad sensorial detectada por la neurona aferente. Tradicionalmente, las neuronas sensoriales se han clasificado en mecanorreceptores, que detectan deformaciones físicas del tejido en el que residen, termorreceptores, que detectan cambios de temperatura, y nociceptores, que responden a una variedad de estímulos mecánicos, térmicos y químicos que puedan causar daño tisular (Kandel et al. 2021) (Fig. 2). Un objetivo importante en el campo ha sido identificar los transductores moleculares sensibles a los diferentes estímulos. Aunque ya en 1979 se describieron corrientes iónicas en respuesta a estimulación mecánica aplicada sobre células ciliadas del epitelio auditivo (Corey y Hudspeth 1979), hubo que esperar hasta finales de los años 90 para la identificación de moléculas especializadas en la transducción de diferentes estímulos somatosensoriales. En concreto, el descubrimiento de los canales iónicos de la familia TRP sensibles a temperatura puso el foco en esta familia de proteínas como moléculas clave en la transducción sensorial (Caterina et al. 1997) (Fig. 3.A).

En 1969, Cosens y Manning registraron en el electrorretinograma de un mutante de *Drosophila melanogaster* unos potenciales de receptor transitorios (*trp* por sus siglas en inglés) en respuesta a la estimulación con luz, denominando así a este fenotipo (Cosens y Manning 1969). La proteína correspondiente se clonó por primera vez en 1989, y tres años más tarde se confirmó como un canal iónico activado por luz (Montell y Rubin 1989; Hardie y Minke 1992).

Desde entonces, los canales TRP han sido protagonistas en la búsqueda de moléculas sensibles a estímulos físicos y químicos. La familia de los canales TRP se divide en 7 subfamilias basadas en la homología de sus secuencias (Fig. 3.A): TRPC (canónica, 7 miembros), TRPV (vaniloide, 6 miembros), TRPA (anquirina, 1 miembro), TRPM (melastatina, 8 miembros), TRPN (NOMP-C, 1 miembro, sólo en peces), TRPP (policistina, 3 miembros) y TRPML (mucolipina, 3 miembros). Estas proteínas forman canales catiónicos no selectivos que permiten el flujo de Ca^{2+} y Na^{+} al interior celular, se expresan en células nerviosas y otros tejidos y participan en multitud de procesos fisiológicos y rutas de señalización (Nilius y Szallasi 2014). Como ejemplos representativos podemos nombrar al canal TRPV1, activado por compuestos vaniloides (como la capsaicina) y temperaturas nocivas, y que contribuye a la sensación de dolor, o TRPM8, activado por mentol y temperaturas frías, y que juega un papel importante en la sensación de frío (Julius 2013).

Además de los canales TRP, otros canales han sido identificados como clave en la transducción de fuerzas mecánicas, como es el caso de los canales de la familia Piezo (Fig. 3.B). Piezo1 participa en la mecanotransducción en multitud de tipos celulares, mediando así procesos como el desarrollo linfático, el mantenimiento de la homeostasis ósea e intestinal y la regulación del volumen eritrocitario (Li et al. 2022). Por su parte, los canales Piezo2 se expresan en neuronas sensoriales del DRG y de los ganglios trigéminos y son fundamentales para la mecanosensibilidad de bajo umbral y la propiocepción, aunque también se ha descrito su expresión en nociceptores (Murthy et al. 2018; Fernández-Trillo et al. 2020).

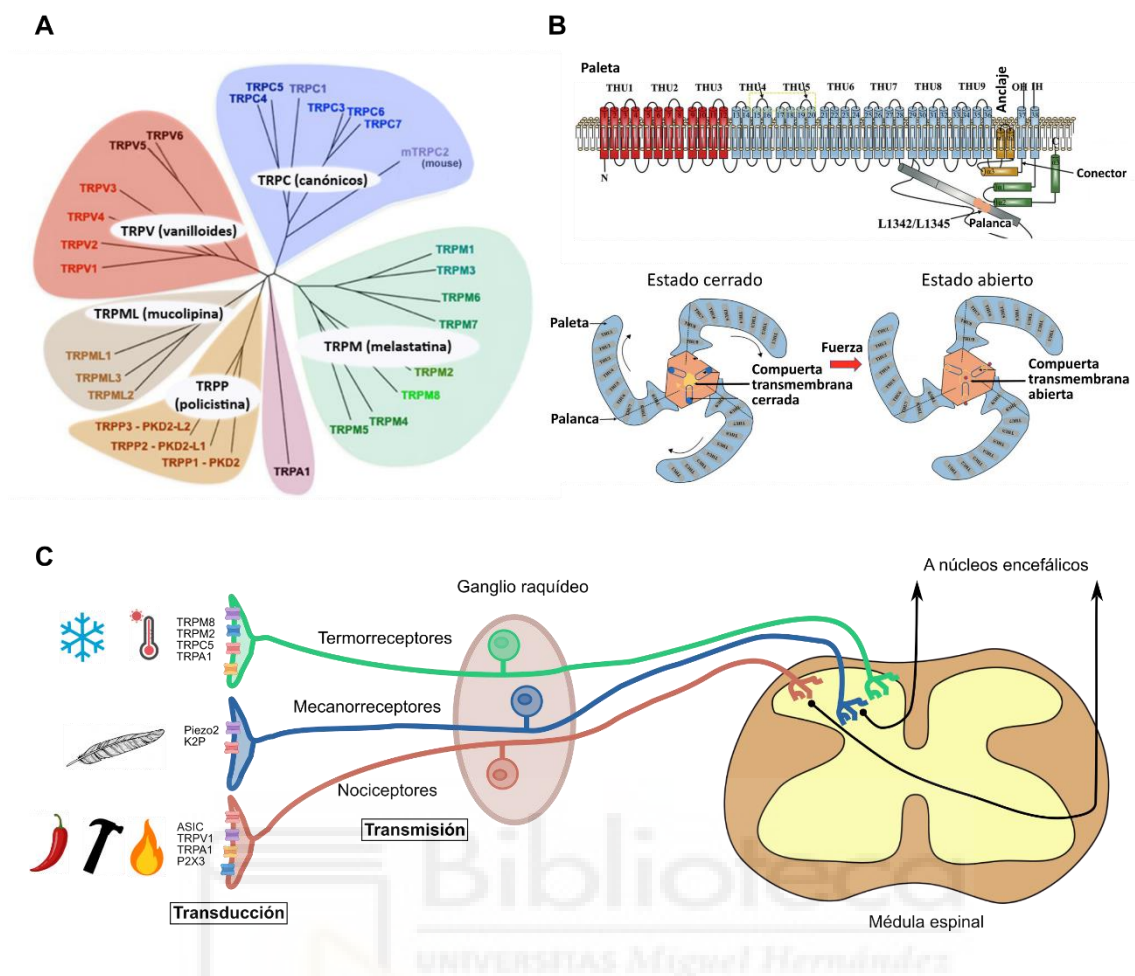


FIGURA 3. Canales iónicos que participan en la transducción sensorial. (A): Árbol filogenético que representa las 7 subfamilias de canales TRP. Cada color representa una subfamilia, clasificadas en base a la homología de sus secuencias. Modificado de [Clapham 2003](#). (B): Los canales Piezo1/2 son homotrímeros formados por un total de 114 dominios helicoidales transmembrana, cuya conformación deja un poro permeable a cationes que se abre tras detectar fuerzas mecánicas. Modificado de [Li et al. 2022](#). (C): La dotación molecular de las neuronas sensoriales confiere la capacidad de detectar estímulos de diferente naturaleza: los termorreceptores pueden expresar canales sensibles a temperatura, como TRPM8, los mecanorreceptores pueden expresar canales que detectan fuerzas mecánicas, como Piezo2, y los nociceptores, canales que se activan ante estímulos de alta intensidad, como TRPV1.

1.1.2. Dolor y nocicepción

Según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), el dolor se describe como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño tisular real o potencial. El dolor cumple una importante función protectora, avisándonos de un daño que puede requerir evasión o tratamiento (Loeser y Treede 2008). Podemos clasificar el dolor en tres tipos: nociceptivo, inflamatorio y patológico. El dolor nociceptivo es el que se percibe en

respuesta a un estímulo intenso, y es esencial para detectar y minimizar el contacto con la fuente de daño, activando reflejos de retirada y generando una sensación desagradable y emociones negativas. El dolor inflamatorio es también adaptativo y protector, potenciando la sensibilidad en zonas que han sufrido daño y facilitando su curación al evitar el contacto con ellas y su movimiento (Woolf 2010). Este dolor está potenciado por la activación del sistema inmune tras daño tisular o infección, y se comentará más adelante. Por último, tenemos el dolor patológico, que no es adaptativo, asociándose a una alteración del sistema somatosensorial. Dentro del dolor patológico podemos situar el dolor neuropático, que resulta de lesiones en el sistema nervioso, causadas por traumatismos, enfermedades metabólicas, infecciones o invasiones tumorales (Costigan, Scholz, y Woolf 2009), y el dolor disfuncional, que se da en situaciones donde no hay estímulos nocivos identificados, pero se exacerban las señales sensoriales que alcanzan el SNC sin existir una causa bien conocida. Ejemplos de dolor disfuncional son la fibromialgia, el síndrome de intestino irritable o la cistitis intersticial (Woolf 2010; von Hehn, Baron, y Woolf 2012).

La nocicepción, por otro lado, es el proceso por el cual los estímulos térmicos, mecánicos o químicos intensos son detectados por una subpoblación de aferentes periféricos llamados nociceptores (Basbaum et al. 2009). Los nociceptores, por tanto, son neuronas excitables que poseen un umbral de activación alto y normalmente sólo responden a estímulos de suficiente energía como para causar daño. Algunos nociceptores están mielinizados (fibras A δ), sus axones tienen una velocidad de conducción más rápida y son señalizadores de un primer dolor más agudo. Sin embargo, la mayoría de los nociceptores se asocian a fibras amielínicas (fibras C), más lentas y responsables de un segundo dolor, más difuso y duradero (Woolf y Ma 2007) (Fig. 4.A, B). El estudio electrofisiológico de los nociceptores A δ ha permitido dividirlos en dos clases: de tipo I, que responden a estímulos mecánicos y químicos pero con umbrales de calor altos (> 50 °C), y de tipo II, con un umbral térmico más bajo pero un umbral mecánico alto (Basbaum et al. 2009). Las fibras C también son heterogéneas: la mayoría son nociceptores polimodales (responden a calor y a estímulos mecánicos y químicos), pero también existen fibras C con otras funciones, como responder a tacto placentero (McGlone, Wessberg, y Olausson 2014), detectar enfriamientos no nocivos (Campero et al. 2001) o señalar el picor (Sun y Chen 2007). Una clase interesante de fibras C son los nociceptores silentes, que son sensibles a calor pero insensibles a estímulos mecánicos hasta que un contexto de irritación, lesión o inflamación les confiere sensibilidad mecánica (Schmidt et al. 1995).

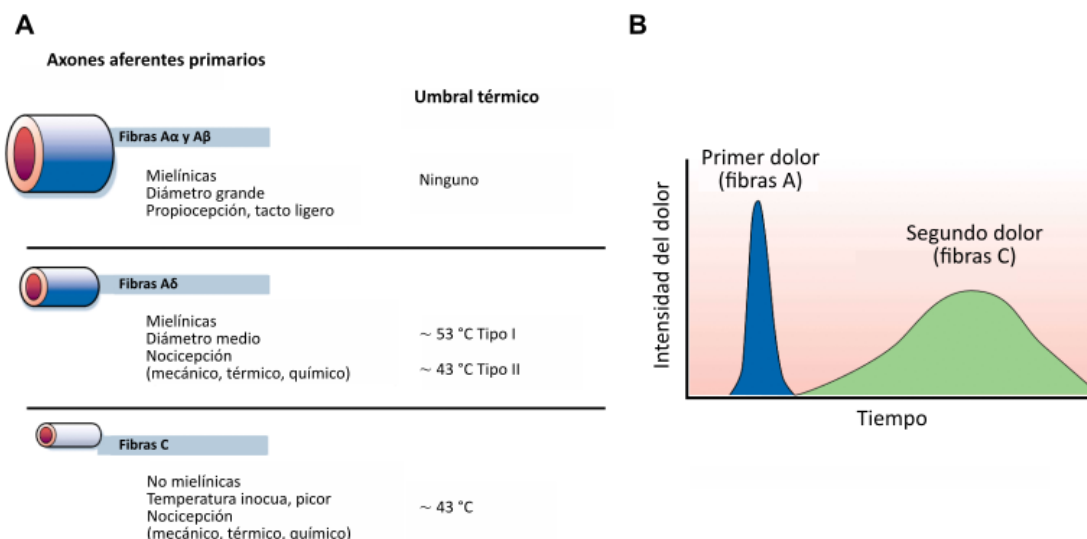


FIGURA 4. Tipos de fibras y su implicación en la nocicepción. (A): Las fibras sensoriales se clasifican en función de su grado de mielinización, lo que condiciona su velocidad de conducción. Entre las de mayor diámetro encontramos las Aα y las Aβ, propias de mecanorreceptores de bajo umbral y propioceptores, mientras que los nociceptores corresponden a los tipos Aδ y C. (B): La velocidad de conducción varía enormemente entre los nociceptores Aδ y C (de 6-25 a 1 m/s respectivamente), y esta velocidad es la que determina su participación en la señalización del primer y el segundo dolor. Modificado de Julius y Basbaum 2001.

1.1.2.1. Nociceptores peptidérgicos y no peptidérgicos

En el ratón, durante las primeras fases del desarrollo postnatal, todos los nociceptores (que constituyen alrededor del 80 % de las neuronas del DRG) expresan el receptor de tropomiosina quinasa A (TrkA), el receptor del factor de crecimiento nervioso (NGF). A medida que el animal se desarrolla, aproximadamente la mitad de esas neuronas pierden la expresión de TrkA y del canal TRPV1, pueden unir la isolectina B4 (IB4) y se sensibilizan al factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF). Son los conocidos como nociceptores no peptidérgicos (Bennett et al. 1996; Snider y McMahon 1998). Estos nociceptores expresan marcadores moleculares como el receptor de ATP P2X3 o el miembro D del receptor acoplado a proteína G relacionado con MAS (MrgprD), inervan preferentemente la epidermis y proyectan a la parte interna o ventral de la lámina II de la médula espinal (Vulchanova et al. 1997; Zylka, Rice, y Anderson 2005). Su eliminación provoca déficits en la percepción del dolor mecánico agudo y en la sensibilización a estímulos mecánicos en contextos inflamatorios, lo que indica su participación en estos procesos (Cavanaugh et al. 2009; Zhang et al. 2013; Pinto et al. 2019).

La otra mitad de nociceptores sigue expresando TrkA, TRPV1 y los péptidos CGRP (péptido relacionado con el gen de la calcitonina) y sustancia P (SP), por lo que son conocidos como nociceptores peptidérgicos (Snider y McMahon 1998). Dichos péptidos actúan como moduladores de la nocicepción, activando procesos como la vasodilatación, la inflamación, o la sensibilización de nociceptores (Brain y Williams 1989; Averill et al. 1995; Bennett et al. 1996; Cavanaugh et al. 2011). Los nociceptores peptidérgicos inervan piel, músculos y vísceras, y proyectan a la parte externa o dorsal de la lámina II de la médula espinal (Zylka et al. 2005). Responden a protones y capsaicina, pueden sensibilizarse por acción del NGF y su eliminación provoca déficits en la sensibilidad al calor nocivo (Dirajlal, Pauers, y Stucky 2003; Malik-Hall, Dina, y Levine 2005; Cavanaugh et al. 2009).

1.1.2.2. Sensibilidad a calor y dolor térmico

Al hacer contacto con un objeto, los humanos reconocemos cuatro tipos de sensaciones térmicas en función de la temperatura del mismo: frío ($< 10^{\circ}\text{C}$, nocivo), frescor (15 a 31°C , inocuo), calidez (36 a 44°C , inocuo) y calor ($> 45^{\circ}\text{C}$, nocivo), y lo hacemos al detectar el contraste con la temperatura de nuestra propia piel, que se encuentra aproximadamente a 33°C (Kandel et al. 2021).

Las fibras sensibles a calor inocuo son generalmente fibras C con actividad continua en el entorno de los 30°C que reducen su frecuencia de disparo tras enfriamientos o aplicación de altas temperaturas (Schepers y Ringkamp 2010). Se han propuesto varios transductores moleculares responsables de esta sensibilidad, como son los canales iónicos TRPV3, TRPV4 o TRPM2 (Fig. 5). TRPV3 y TRPV4 se expresan fundamentalmente en queratinocitos, que se comunican con las neuronas sensoriales vía ATP y óxido nítrico. Estos canales se activan por temperaturas cálidas, y se ha observado que animales *knockout* para estos genes pierden la discriminación del calor en rangos inocuos (Lee et al. 2005; Moqrich et al. 2005), aunque el efecto varía entre cepas de ratones (Huang et al. 2011). El canal TRPM2 también se activa con temperaturas cálidas, de entre 34 y 42°C , y es importante para la correcta detección de calor inocuo (Tan y McNaughton 2016). Curiosamente, se ha demostrado que el bloqueo del canal TRPV1 dificulta la detección de calor inocuo en el ratón (Yarmolinsky et al. 2016). Sin embargo, un estudio reciente demuestra que las señales transmitidas por fibras C sensibles a temperaturas cálidas no son indispensables para la detección de estas temperaturas. Curiosamente, para percibir estos estímulos, es necesaria una subpoblación de neuronas

sensibles a frío, que disparan de manera tónica hasta que el ascenso de la temperatura las silencia (Paricio-Montesinos et al. 2020). Por lo tanto, los mecanismos concretos que median la detección de temperaturas cálidas están aún por dilucidar.

Por otro lado, las fibras sensoriales involucradas en la percepción del calor doloroso se dividen en dos tipos: A δ , capaces de detectar la señal nociva de manera rápida, y C, de activación más lenta pero sostenida (Treede et al. 1995). Ambos tipos de fibras forman sinapsis glutamatérgicas en la medula espinal y pueden establecer arcos reflejos que provocan movimientos de retirada. La exposición prolongada a calor nocivo puede provocar daño tisular y liberación de ATP, protones y especies reactivas de oxígeno, que pueden activar a otros nociceptores (Vriens, Nilius, y Voets 2014). Entre los canales iónicos responsables de la detección del calor nocivo destaca TRPV1. Este canal se activa por altas temperaturas, pH ácido y básico, compuestos vaniloides y moléculas lipídicas endógenas. Cuando se elimina TRPV1, se reducen muy significativamente las respuestas a capsaicina y a calor ($> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$) y no aparece la hiperalgesia al calor asociada a la inflamación, pero se mantienen las respuestas a calor de más de $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Caterina et al. 1997, 2000; Davis et al. 2000). Por ello, debieron postularse otros candidatos para explicar estas respuestas a calor nocivo. Se consideró TRPV2, que se expresa en los DRG y responde a temperaturas de más de $52\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero su eliminación en el ratón no ocasiona déficits en la sensación de calor nocivo (Vriens et al. 2014). TRPM3 está presente en nociceptores y responde a altas temperaturas de manera similar a TRPV1. El ratón *knockout* para TRPM3 muestra déficits en la aversión al calor nocivo y en el desarrollo de hiperalgesia térmica en tejidos inflamados. Sin embargo, la inhibición farmacológica de TRPV1 en el ratón que no expresa TRPM3 no elimina por completo las respuestas a estímulos térmicos nocivos (Vriens et al. 2011), por lo que se asume que estos terminales deben expresar algún transductor adicional de calor. La generación de un triple *knockout* para TRPV1, TRPM3 y TRPA1, que mostraba ausencia de retirada ante la exposición a estímulos de calor nocivo pero que mantenía respuestas a frío, a estímulos mecánicos y preferencias por temperaturas moderadas llevó a señalar a TRPA1 como el tercer transductor de calor nocivo. En el trabajo de Vandewauw y colaboradores, se demuestra que es necesaria la eliminación de los tres canales para abolir por completo las respuestas al calor nocivo (Vandewauw et al. 2018) (Fig. 5). Además, diversos estudios identifican otros canales y moléculas como sensores o moduladores de la sensación térmica nociva, como canales de cloruro Anoctamina1 (ANO1), el complejo STIM1-Orai1 o canales de potasio y de sodio dependientes de voltaje (Xiao et al. 2011; Cho et al. 2012; Vriens et al. 2014).

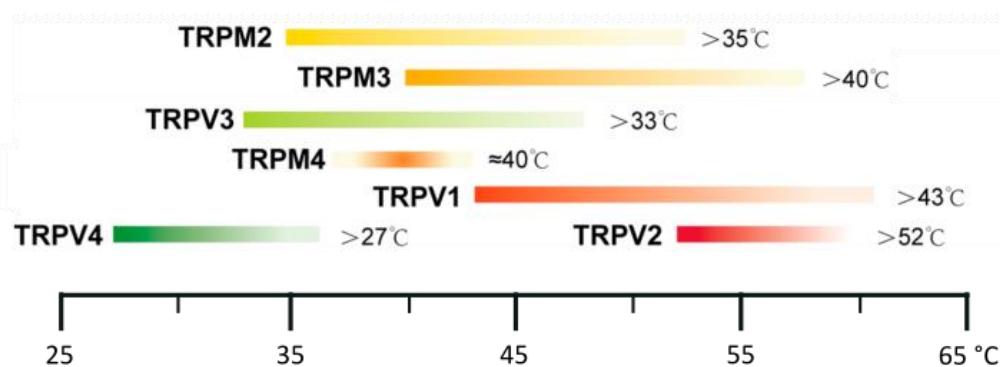


FIGURA 5. Canales iónicos TRP sensibles a calor. Principales canales TRP implicados en la transducción de sensaciones térmicas inocuas y nocivas, expresados por neuronas sensoriales y otros tipos celulares en la piel. Modificado de [Zong et al. 2022](#).

1.1.3. Inflamación y dolor inflamatorio

La inflamación comienza cuando los tejidos del organismo responden a distintos insultos, como un daño infeccioso, traumático, isquémico, físico o químico. La exposición a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, productos bacterianos o virales) o asociados a daño (DAMPs, señales endógenas de daño celular) provocan la liberación por parte de los propios nociceptores (en la llamada inflamación neurogénica), así como de otras células no neurales (mastocitos, basófilos, macrófagos, células endoteliales, queratinocitos, etc.), de citoquinas, quimioquinas y otras moléculas que median el reclutamiento de otras células del sistema inmune y cambios vasculares. Entre estas sustancias se encuentran péptidos y proteínas como la bradiquina, la SP, el NGF, el CGRP, y otras moléculas como ATP, histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos y acetilcolina (McMahon et al. 2013; Bennett et al. 2018). Los signos cardinales de la inflamación tisular son rubor, calor, dolor y turgencia, resultantes de la vasodilatación y la extravasación (Kandel et al. 2021).

Con el objetivo de limitar la utilización normal del área dañada y favorecer su curación, los nociceptores poseen varios tipos de receptores capaces de reconocer y responder a estas sustancias, modificando la expresión génica y la regulación de canales iónicos. Esto aumenta su excitabilidad y sensibiliza la fibra a estímulos térmicos y mecánicos en un proceso conocido como sensibilización periférica. Este proceso aumenta las respuestas del nociceptor a estímulos nocivos (hiperalgesia), y le permite señalar estímulos inocuos, que serán percibidos como dolorosos (alodinia) (Woolf y Ma 2007; Basbaum et al. 2009).

Uno de los principales mecanismos de sensibilización periférica que provoca el desarrollo de hipersensibilidad mecánica y térmica en inflamación consiste en el aumento de expresión y actividad del canal TRPV1 (Caterina et al. 2000; Li et al. 2021), desencadenada por mediadores inflamatorios como el NGF (Chuang et al. 2001; Ji et al. 2002), la bradiquinina (Premkumar y Ahern 2000; Chuang et al. 2001), la anandamida (Premkumar y Ahern 2000) o las prostaglandinas (Moriyama et al. 2005). Otros canales, como los receptores de ATP P2X, los canales sensibles a pH ácido (ASICs) o los canales de sodio dependientes de voltaje Na_v1.7 y Na_v1.8, también ven aumentada su expresión o sus respuestas en contextos inflamatorios (Xu y Huang 2002; Liang et al. 2013; Duzhyy, Voitenko, y Belan 2021). El canal TRPA1 desempeña también un rol fundamental. Se expresa en muchos nociceptores TRPV1⁺ y reconoce una plétora de mediadores inflamatorios y señales de estrés. Su apertura activa el nociceptor, señalizando dolor y promoviendo la liberación de CGRP, SP y neuroquinina A en el tejido dañado, lo que sensibiliza a las terminaciones nerviosas de esa zona (Bautista, Pellegrino, y Tsunozaki 2013; Viana 2016). Su papel en este proceso se revisará en un apartado posterior.

Este cambio fenotípico de los nociceptores también tiene un efecto a nivel central. La inflamación induce un aumento en la expresión de TRPV1 y la liberación de glutamato, SP y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el asta dorsal de la médula espinal, activando la microglía de esa región y provocando la sensibilización en las neuronas de segundo orden (Woolf y Thompson 1991; Abooj et al. 2016; Gu et al. 2022), en un proceso conocido como sensibilización central. Las neuronas de la médula espinal implicadas en este proceso se describirán más adelante.

1.1.3.1. El modelo inflamatorio del CFA

En 1937, Freund y colaboradores descubrieron que la administración de una suspensión en parafina de bacilos muertos de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) provocaba un aumento de la sensibilidad y de los niveles de anticuerpos en conejos y cobayas (Freund, Casals, y Hosmer 1937). Desde entonces, esta suspensión, conocida como adyuvante completo de Freund (CFA), se ha utilizado ampliamente como inductor de estados inflamatorios. El CFA actúa como activador del sistema inmune innato, activando las células dendríticas y estimulando la secreción de citoquinas y quimioquinas, lo que provoca un aumento en la expresión de sustancias algésicas como el NGF, la SP y el CGRP (Woolf et al. 1994; Billiau y Matthys 2001; Chen et al. 2010). La administración de CFA por vía intraplantar en la extremidad posterior de ratones

y ratas ha sido un modelo experimental de dolor inflamatorio habitual, pero otras zonas, como la piel del área orofacial, también han sido objeto de estudio (Krzyzanowska et al. 2011; Shinoda et al. 2011). En todos los casos, en la zona de la inyección aparece eritema y edema 6 horas después de la inyección, efecto que se prolonga durante días e incluso durante varias semanas; también se observa una disminución de los umbrales de respuesta ante la aplicación de estímulos mecánicos y térmicos (tanto de calor como de frío), manifestada por comportamientos de retirada, retracción o lamida de la zona inflamada tras la estimulación. Este aumento de la sensibilidad se hace evidente pocas horas tras la inyección y se extiende durante más de 10 días en la mayoría de los casos, describiéndose en algunos estudios cierta sensibilización contralateral (Stein, Millan, y Herz 1988; Woolf et al. 1994; Ji et al. 2002; Chen et al. 2010; da Costa et al. 2010; Pitzer, Kuner, y Tappe-Theodor 2016; Sheahan et al. 2017; Shen et al. 2018; Lu et al. 2021). Además de los comportamientos de retirada, retracción o lamida que se observan como consecuencia del descenso de los umbrales de dolor térmico y mecánico, otros comportamientos se ven alterados tras la administración de CFA. En el ratón, su inyección intraplantar produce una disminución en la actividad locomotora voluntaria, un peor desempeño en la prueba de rotarod y un patrón de marcha y de pisada alterados, sin producir cambios en la interacción social ni comportamientos ansiosos. Curiosamente, aunque el edema y la hipersensibilidad mecánica y térmica pueda durar varias semanas, la alteración en estos comportamientos no se prolonga durante más de 2 o 3 días (Cobos et al. 2012; Pitzer et al. 2016; Sheahan et al. 2017; Altarifi, Alsalem, y Mustafa 2019).

Los mecanismos moleculares que activa el CFA para desencadenar la hipersensibilidad son varios. En las neuronas sensoriales primarias, se ha demostrado que aumenta la expresión de NGF y de TRPV1 (Shinoda et al. 2011), así como de los canales de sodio $Na_v1.7$ y $Na_v1.8$ por la vía de la ciclooxygenasa (Gould et al. 2004), alterando la excitabilidad de estas células. También induce la expresión de la óxido nítrico sintasa (NOS) en la piel, enzima que regula la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF (Chen et al. 2010), y en la médula espinal, aumenta la expresión de TLR4 y TRAF6 en microglía (Zhao, Zhang, y Li 2015; Lu et al. 2021). La inhibición o el bloqueo de estos mecanismos consigue paliar la disminución en los umbrales térmicos y mecánicos inducidos por la inflamación por CFA, y entre ellos cabe destacar el bloqueo de algunos canales de la familia de los TRP, como TRPV1, TRPM3 y TRPA1 (Eid et al. 2008; Shinoda et al. 2011; Krügel et al. 2017).

1.2. El canal iónico TRPA1

La subfamilia TRPA de canales TRP recibe su nombre por las numerosas repeticiones de anquirina en su dominio N-terminal. El único canal de esta subfamilia descrito en mamíferos es el TRPA1, clonado por primera vez a partir de fibroblastos pulmonares humanos (Jaquemar, Schenker, y Trueb 1999).

1.2.1. Estructura del canal TRPA1

TRPA1 está constituido por cuatro subunidades idénticas de alrededor de 1100 aminoácidos cada una, que se ensamblan formando un canal no selectivo permeable a los iones Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} (Nilius y Flockerzi 2014). Cada monómero está formado por 6 segmentos transmembrana (S1-S6), de los cuales dos (S5 y S6) flanquean el poro permeable a cationes, más las porciones intracelulares C- y N- terminal (Fig. 6.A). Las hélices alfa de la porción C- terminal de las cuatro subunidades se enrollan formando una hélice superenrollada bajo el poro, y están rodeadas por una porción de N- terminal (Brewster y Gaudet 2015). En la porción N- terminal se localizan, en vertebrados, de 14 a 18 repeticiones de anquirina (Gaudet 2008), de donde proviene el nombre del canal (Fig. 6.A). A estas anquirinas no se les ha atribuido actividad enzimática, y se han considerado como regiones fundamentales para la interacción proteína-proteína y para la inserción del canal en la membrana (Nilius, Appendino, y Owsianik 2012) pero, además de lo dicho, también contienen residuos de cisteína a los que se unen algunos agonistas de TRPA1 que inducen modificaciones covalentes del N- terminal y provocan la apertura del canal (Hinman et al. 2006; Macpherson et al. 2007). Además, algunas de estas repeticiones son necesarias para las sensibilidades mecánica, térmica y a calcio que se han descrito para este canal (Cordero-Morales, Gracheva, y Julius 2011; Hwang, Stearns, y Tracey 2012; Tang et al. 2020).

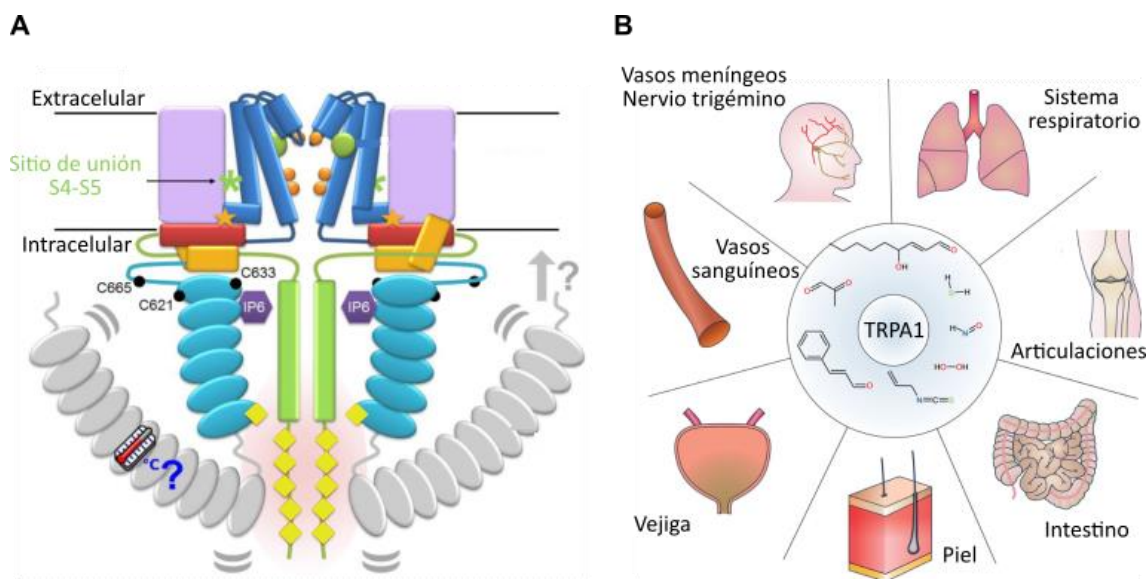


FIGURA 6. Estructura y distribución del canal TRPA1. (A): Representación esquemática del canal TRPA1. Se representan, de N- a C-terminal: en gris, repeticiones de anquirina de 1 a 11; en turquesa, repeticiones de anquirina de 12 a 16; en naranja, dominio de enlace; en lila, las regiones transmembrana de S1 a S4; en azul, las regiones que forman el poro S5 y S6; en rojo, el dominio TRP y en verde, C- terminal. Se marcan 3 de las cisteínas importantes para la respuesta a compuestos electrofílicos (C621, C633 y C665) y el sitio de unión en S4-S5, para los no electrofílicos. Modificado de Brewster y Gaudet, 2015. (B): Distribución del canal TRPA1. Aunque TPA1 se ha estudiado principalmente en el sistema nervioso periférico, se expresa ampliamente en varios tejidos considerados de barrera, como el endotelio de los vasos sanguíneos, la piel, el intestino o el sistema respiratorio. En esos tejidos, actúa como centinela molecular de señales de estrés y daño tisular. Modificado de [Viana 2016](#).

1.2.2. Distribución del canal TRPA1

En 2003, Story y colaboradores demostraron la expresión del canal TRPA1 en fibras nerviosas no mielinizadas de los DRG, coexpresándose con marcadores de nociceptores como CGRP y TRPV1 (Story et al. 2003). Su expresión no se limita a los ganglios raquídeos, sino que trabajos posteriores lo identifican también en los ganglios trigéminos y nodosos (Nagata et al. 2005). Además de en las terminaciones sensoriales, se ha descrito la expresión de TRPA1 en la corteza somatosensorial (Kheradpezhough et al. 2017), en células del sistema auditivo, en células enterocromafines, células endoteliales y en queratinocitos (Fernandes, Fernandes, y Keeble 2012), así como en células del sistema inmune (Naert, López-Requena, y Talavera 2021) y células gliales (Fig. 6.B). En astrocitos corticales, por ejemplo, TRPA1 funciona como regulador de los niveles de calcio intracelular (Shigetomi et al. 2012), mientras que en células de Schwann y en

células de glía de satélite del DRG, parece contribuir a la sensibilización de los nociceptores en contextos inflamatorios (De Logu et al. 2017; Shin et al. 2020). Un trabajo reciente de Patil y colaboradores cuestiona la expresión de TRPA1 en glía en condiciones fisiológicas, restringiendo por tanto su expresión a aferentes sensoriales, células de las mucosas de estómago y colon y células de Hensen en el órgano de Corti (Patil et al. 2023).

1.2.3. Agonistas del canal TRPA1

En un primer momento, se describió a TRPA1 como un canal catiónico que se activaba por bajas temperaturas ($\approx 10\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Story et al. 2003) y, aunque algunos estudios no observan tal sensibilidad (Nagata et al. 2005; Bautista et al. 2006), otros han demostrado que es un canal termosensible que se activa a temperaturas bajas y altas (Fajardo et al. 2008; Karashima et al. 2009; Moparthy et al. 2016, 2022). Por otro lado, está demostrada su función como detector de sustancias irritantes, marcadores de daño y estrés celular o mediadores inflamatorios. En este sentido se han descrito multitud de agonistas para este canal, como el isotiocianato de alilo y la alicina, que son extractos presentes en la mostaza, el rábano picante y el ajo (Jordt et al. 2004; Bautista et al. 2006), mediadores inflamatorios (Bandell et al. 2004), irritantes ambientales (Gerhold y Bautista 2008), productos de estrés oxidativo (Andersson et al. 2008) o endotoxinas bacterianas (Meseguer et al. 2014; Viana 2016). En otros estudios se ha descrito además su capacidad de transducir fuerzas mecánicas (Vilceanu y Stucky 2010), y ratones *knockout* para este gen presentan deficiencias en sus respuestas a estímulos mecánicos (Kwan et al. 2009; Zappia et al. 2017). Aunque su papel en la transducción del calor nocivo no se ha considerado fundamental, sí se ha demostrado que es sensible a calor en el rango inocuo (Moparthy et al. 2016), y algunos estudios lo señalan como clave para la determinación del umbral térmico (Hoffmann et al. 2013). Más recientemente, y como ya se ha comentado, se ha incluido como miembro de la triada de canales TRP (TRPV1-TRPM3-TRPA1) fundamentales para la detección de altas temperaturas (Vandewauw et al. 2018).

1.2.4. Papel de TRPA1 en la inflamación y sensibilización

El amplio catálogo de sustancias que pueden activar al canal TRPA1 lo convierten en un detector óptimo de un posible daño tisular (Viana 2016). Su expresión es exclusiva de fibras C, y

su activación inicia el mecanismo de la inflamación neurogénica a través de la liberación de CGRP, SP y neuroquinina A en tejidos y vasos afectados, con sus consecuentes efectos de vasodilatación, edema e infiltración leucocitaria (Earley 2012; Meseguer et al. 2014; Gouin et al. 2017). Gracias a ello, TRPA1 se postula como un actor importante en una gran variedad de síndromes inflamatorios secundarios a la acción de irritantes ambientales y proalgésicos endógenos (Julius 2013).

Trabajos realizados en modelos inflamatorios del dolor, como el del CFA descrito previamente, han demostrado que el canal TRPA1 juega un papel importante en el desarrollo de la hipersensibilidad característica de estos modelos, ya que su inhibición local bloquea la alodinia e hiperalgesia mecánica y térmica que se desarrolla tras la inflamación, permaneciendo intactas las respuestas agudas (Petrus et al. 2007; da Costa et al. 2010; del Camino et al. 2010). En el modelo de la formalina, compuesto que activa TRPA1 (McNamara et al. 2007), aparece una primera fase de dolor agudo y una secundaria más prolongada, dependiente de la sensibilización de circuitos espinales (Tjølsen et al. 1992). En modelos de enfermedades inflamatorias intestinales se ha observado un aumento en la expresión de TRPA1, tanto en terminales del colon como en la médula espinal (Li et al. 2016).

En los últimos años, se ha puesto el foco en la expresión de TRPA1 en la médula espinal y su papel en la sensibilización y la transición del dolor agudo al dolor crónico. La activación de TRPA1 tanto a nivel periférico (Malmberg y Yaksh 1995) como en sinaptosomas espinales (Quallo et al. 2015) provoca la liberación de CGRP, aminoácidos excitatorios y prostaglandinas en el asta dorsal; la administración por vía intratecal de antagonistas de este canal disminuye la vasodilatación, la hipersensibilidad y la fase de dolor prolongado resultantes de la inyección de sustancias algésicas como la formalina, la capsaicina o el CFA (da Costa et al. 2010; Wei et al. 2011; Martínez-Rojas et al. 2018). Todos estos datos apuntan a TRPA1 como actor fundamental en el desarrollo de hipersensibilidad y en la prolongación de los estados de dolor en modelos inflamatorios. Sin embargo, se desconoce la identidad de las neuronas espinales postsinápticas a las fibras TRPA1⁺.

1.3. La médula espinal

1.3.1. Estructura y organización

La médula espinal se incluye dentro del sistema nervioso central, y constituye la primera estación de relevo de la información sensorial desde la periferia. La médula espinal del ratón se divide típicamente en 34 segmentos, determinados por la emergencia de los distintos nervios espinales: 8 cervicales (C1-C8), 13 torácicos (T1-T13), 6 lumbares (L1-L6), 4 sacros (S1 a S4) y 3 coccígeos (Co1-Co3). En su porción cervical (C5-T1) y lumbar (L2-L6), la sustancia gris aparece engrosada, por ser las regiones de donde parten los nervios que inervan las extremidades anteriores y posteriores respectivamente (Watson y Kayalioglu 2009). Las terminales centrales de las neuronas sensoriales primarias entran en la médula espinal a través de las raíces dorsales. Una vez en el asta dorsal de la médula espinal, estos axones emiten colaterales que ascienden o descienden a lo largo de uno o dos segmentos medulares antes de penetrar en la sustancia gris del asta dorsal, estableciendo su primera sinapsis con neuronas de segundo orden (Purves et al. 2018).

La sustancia gris de la médula espinal es heterogénea en términos de tamaño, forma y densidad de sus células, pero muestra cierta organización histológica, lo que permitió que Rexed definiera 10 zonas regulares o láminas (descritas como láminas I-IX y un área X alrededor del conducto central) (Rexed 1954) (Fig. 7.A). Estas láminas son similares en todos los mamíferos, y sus células muestran unos patrones bioquímicos, funcionales y de conectividad característicos de cada lámina (Heise y Kayalioglu 2009). Generalmente se considera como asta dorsal o posterior las láminas I-VI, que por norma general contienen neuronas que reciben información sensorial (igual que el área X, que parece recibir información sensorial visceral), mientras que las láminas VII-IX forman el asta ventral, con interneuronas involucradas en coordinación de movimientos y motoneuronas (Heise y Kayalioglu 2009; Haines y Mihailoff 2017).

Existe una organización muy precisa de la información que llega a la médula espinal desde la periferia. Los nociceptores A δ , que transmiten las primeras señales de dolor, hacen sinapsis en neuronas de láminas I y V. Las fibras A β , más rápidas y de bajo umbral, responden al tacto ligero no nocivo y proyectan a las láminas III, IV y V. En cambio, los nociceptores C terminan en láminas más superficiales: los peptidérgicos en la lámina I y la parte externa de la II (IIo), y los no peptidérgicos, en la parte interna de la lámina II en su porción dorsal (IIi dorsal, Fig. 7.B). En registros electrofisiológicos de la médula espinal, se demostró que las neuronas de lámina I

respondían a estímulos nocivos, las de láminas III y IV a estimulaciones inocuas, y las de lámina V a ambos tipos de estímulos, por vía directa monosináptica (información conducida por fibras A β y A δ) o vía indirecta polisináptica (información conducida por fibras C) (Basbaum et al. 2009; Braz et al. 2014).

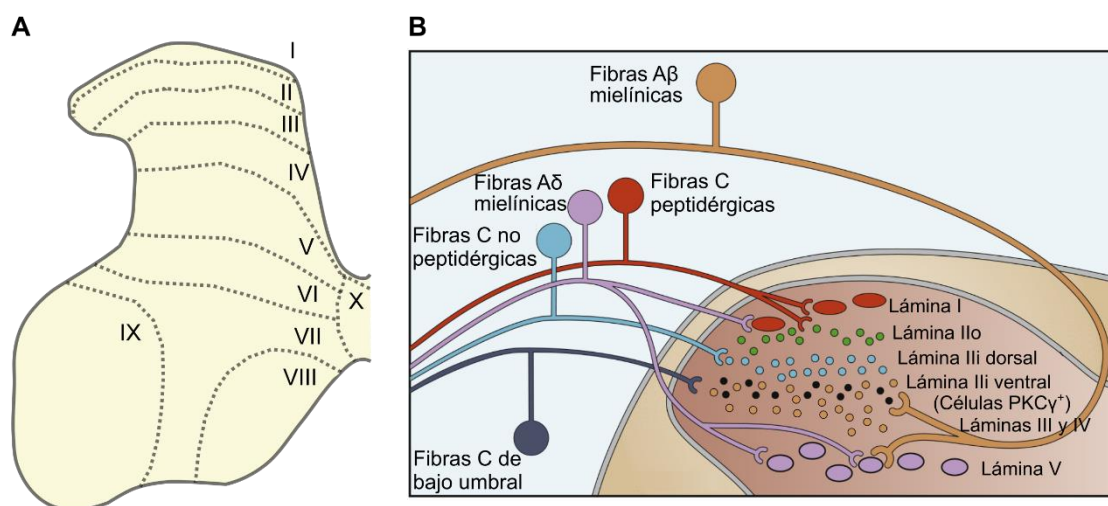


FIGURA 7. Organización laminar y aferencias de la médula espinal. (A): División propuesta por Rexed de la sustancia gris de la médula espinal de ratón en 10 láminas (I-X). (B): Organización de las aferentes sensoriales en su entrada al asta dorsal de la médula espinal. Las fibras C peptidérgicas hacen sinapsis con neuronas de las láminas I y II externa (IIo), las no peptidérgicas, con neuronas de la lámina II interna (IIi) dorsal y los nociceptores A δ , con neuronas en las láminas I y V. Las fibras A β y C que transmiten el tacto inocuo terminan en las láminas que van de la IIi ventral a la V. Modificado de [Braz et al. 2014](#).

1.3.2. Subpoblaciones neuronales en el asta dorsal

Dentro de la sustancia gris de la médula espinal dorsal, encontramos dos tipos de neuronas. La fracción minoritaria (< 1 %) está constituida por las neuronas de proyección, origen de múltiples vías ascendentes que transmiten información sensorial y que hacen relevo en centros superiores. Desde estos núcleos, la información alcanzará el tálamo y, finalmente, la corteza cerebral, donde se distinguen los aspectos discriminativos y emocionales de la información sensorial (Basbaum et al. 2009). Por otro lado, se encuentran las interneuronas, que componen el 99 % de todas las neuronas del asta dorsal y actúan como intermediarias entre las neuronas sensoriales, las neuronas de proyección y las neuronas motoras, formando circuitos locales. La

función de estas interneuronas es dar paso y priorizar la información que alcanza el sistema nervioso central (Hughes y Todd 2020).

1.3.2.1. *Neuronas de proyección*

Los somas de la mayoría de neuronas de proyección involucradas en la transmisión del dolor y la temperatura en ratón y rata se encuentran mayoritariamente en la lámina I y dispersas por las láminas III-V, aunque también se han encontrado poblaciones en las láminas VII y VIII (Wercberger y Basbaum 2019). La lámina V por su parte contiene las neuronas de proyección de amplio rango dinámico (*wide dynamic range*, WDR), que responden tanto a estímulos nocivos como a inocuos (Braz et al. 2014). La mayoría de los axones de las neuronas involucradas en la transmisión del dolor y la temperatura proyectan al lado contralateral conformando el tracto anterolateral, y alcanzan varias regiones del encéfalo, incluyendo el bulbo caudal ventrolateral, el núcleo del tracto solitario, el núcleo parabraquial lateral (LPB), la sustancia gris periacueductal, el tálamo y el hipotálamo (Todd 2010; Abaira y Ginty 2013). En el caso de la lámina I, las neuronas de proyección constituyen un 5 % del total de neuronas, y la gran mayoría (> 90 %) proyectan al LPB, aunque emiten colaterales que pueden integrarse en otros niveles medulares o alcanzar otras áreas de las mencionadas anteriormente (Al-Khater y Todd 2009). El alto porcentaje de proyecciones sobre el LPB hace que la mayoría de los estudios sobre neuronas de proyección empleen inyecciones para el trazado retrógrado desde este núcleo.

Las poblaciones de neuronas de proyección involucradas en nocicepción no son homogéneas, y existe un creciente interés en su clasificación. Son neuronas glutamatérgicas (Todd 2017), y el marcador más ampliamente utilizado para su identificación es el receptor de neuroquinina 1 (NK1R) (Fig. 8), presente en aproximadamente el 80 % de las neuronas de proyección de la lámina I y activado por la SP, liberada por los terminales centrales de los nociceptores tras su estimulación (Littlewood et al. 1995). Las neuronas de proyección pueden clasificarse también en multipolares, fusiformes o piramidales en función de la orientación y ramificación de sus dendritas (Todd 2010). Las neuronas de proyección NK1R⁺ nociceptivas suelen ser multipolares o fusiformes, mientras que las NK1R⁻ no nociceptivas suelen ser piramidales (Almarestani et al. 2009; Braz et al. 2014). Entre las neuronas de proyección de las láminas III-V, la expresión de NK1R es menor, de alrededor de un 44 %. Aunque su soma se encuentra más profundo, extienden sus árboles dendríticos hasta la lámina I, así que reciben inputs tanto de fibras A β de bajo umbral como de aferentes SP⁺ (Wercberger y Basbaum 2019).

Además de las neuronas NK1R⁺ de la lámina I, existe entre las NK1R⁻ una población de neuronas de proyección de soma muy grande, activadas por estímulos nocivos y que reciben input sináptico excitatorio e inhibitorio muy abundante por parte de interneuronas (Todd 2010) (Fig. 8).

La aplicación de estímulos nocivos, como la formalina y el calor o frío nocivos, inducen la expresión del gen *cfos*, marcador de actividad, en un porcentaje alto de las neuronas de proyección (Todd et al. 2002; Polgár et al. 2008), y la eliminación de las neuronas NK1R⁺ en lámina I provoca una disminución de la hiperalgesia mecánica y térmica causada por capsaicina (Mantyh et al. 1997), lo que implica un papel fundamental de estas neuronas en la señalización del dolor y el desarrollo de la hipersensibilidad. Estudios recientes de imagen *in vivo* de la médula espinal han demostrado que las neuronas espinoparabraquiales de la lámina I responden con un perfil predominantemente polimodal a estímulos mecánicos y térmicos sólo en el rango nocivo, pero destaca una población separada sensible al frío inocuo con distinta morfología y propiedades fisiológicas (Hachisuka, Koerber, y Ross 2020; Chisholm et al. 2021). A pesar de que estos estudios confirman el papel polimodal de muchas neuronas de proyección, se han caracterizado distintas subpoblaciones de neuronas espinoparabraquiales, tanto NK1R⁺ como NK1R⁻, cuya diversidad molecular puede determinar el procesamiento del picor, el dolor y el tacto afectivo (Choi et al. 2020; Wercberger et al. 2021).

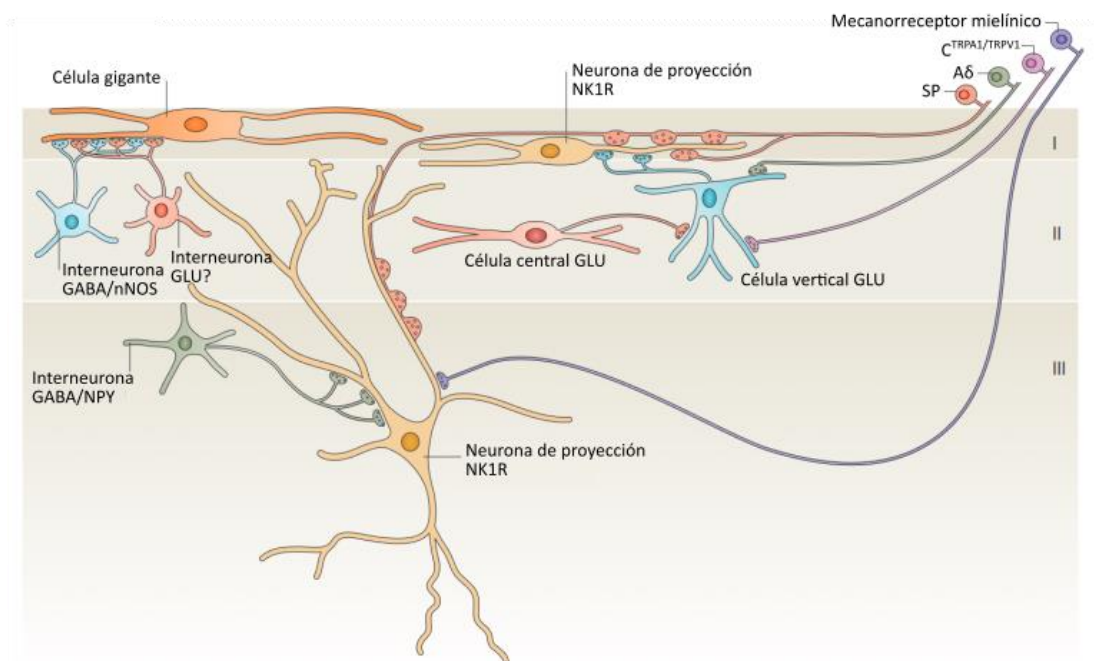


FIGURA 8. Circuitos neuronales establecidos entre aferentes sensoriales, interneuronas y neuronas de proyección. Se muestran tres neuronas de proyección: dos NK1R⁺ en las láminas I y III y una célula gigante NK1R⁺ en la lámina I. Ambas NK1R⁺ reciben invasión de aferentes SP⁺, y la de la lámina III recibe además de mecanorreceptores de bajo umbral. Estas neuronas de proyección reciben input tanto de interneuronas excitatorias (GLU) como inhibitorias (GABA). Modificado de Todd 2010.

1.3.2.2. Interneuronas

La mayoría de las neuronas en las láminas I y III, y la práctica totalidad de neuronas en la lámina II, emiten axones que permanecen en la médula espinal, mientras que sus árboles dendríticos se ramifican localmente, por lo que se las denomina interneuronas (Todd 2010) (Fig. 8). La heterogeneidad de su morfología, propiedades electrofisiológicas, conectividad y perfiles transcripcionales reflejan el complejo rol de las células del asta dorsal en la integración y modulación de la información sensorial (Peirs, Dallel, y Todd 2020).

La clasificación de las interneuronas espinales es compleja. Ya en 2002, Grudt y Perl propusieron una clasificación morfológica, que correlaciona solo parcialmente con una identidad funcional. Dividieron las interneuronas en *islet* (emiten largas prolongaciones rostrocaudales en la misma lámina), centrales (similares a las *islet* pero con prolongaciones más cortas), verticales (con amplios árboles dendríticos que se extienden dorsoventralmente invadiendo otras láminas) y radiales (con un árbol dendrítico restringido y axón variable) (Fig. 8,

9) (Grudt y Perl 2002). Esta clasificación se ha seguido utilizando, aunque se han descrito interneuronas que no encajan en ninguno de estos tipos (Yasaka et al. 2010). Las propiedades electrofisiológicas, y más concretamente el patrón de disparo evocado por la inyección de corriente, también han sido utilizadas como elemento clasificador. Se distinguen varios patrones de disparo, siendo los más abundantes el tónico, el retrasado, el inicial y el simple (Fig. 9) (Graham y Hughes 2020). Estos patrones de disparo vienen definidos por la expresión de distintos canales iónicos, particularmente las conductancias a potasio tipo A y tipo K_v1 (Balachandar y Prescott 2018). Cada clase morfológica presenta un patrón de disparo característico: por regla general, las *islet*, las centrales y algunas verticales disparan de manera tónica o inicial, mientras que otras verticales y las radiales muestran un patrón retrasado (Yasaka et al. 2010; Todd 2017).

Sin embargo, la clasificación más habitual de las interneuronas se hace en base a su naturaleza neuroquímica, dividiéndose en dos grandes clases: inhibitorias y excitatorias. Las inhibitorias utilizan como neurotransmisores el ácido γ -aminobutírico (GABA) o la glicina; en ratón y rata, alrededor del 30 % de las neuronas de las láminas I, II y III son GABAérgicas (Polgár, Durrieux, et al. 2013). Una porción de estas interneuronas GABAérgicas co-expresa glicina, especialmente aquellas de la lámina III (Todd y Sullivan 1990; Zeilhofer, Wildner, y Yevenes 2012). Generalmente se considera que las interneuronas que no son GABAérgicas, son excitatorias: éstas utilizan glutamato como neurotransmisor y se reconocen por su expresión del transportador vGLUT2, visible en los terminales axónicos (Todd et al. 2003). Las técnicas de secuenciación de RNA de célula única han permitido profundizar en el estudio de la identidad de estas poblaciones neuronales. En 2018, Haring y colaboradores identificaron 15 tipos moleculares de neuronas excitatorias (clusters Glut1-15) y 15 inhibitorias (clusters Gaba1-15) en el asta dorsal de la médula espinal del ratón (Fig. 9) (Häring et al. 2018). Utilizando este y otros conjuntos de datos, Russ y colaboradores generaron un atlas de tipos celulares espinales, en el que ampliaron a 30 los clusters excitatorios y a 21 los inhibitorios en la porción dorsal de la médula. Además, observaron mayor diversidad entre las neuronas dorsales que entre las ventrales, y describieron los clusters dorsales como grupos discretos, fácilmente distinguibles mediante conjuntos de marcadores específicos, mientras que los ventrales presentaban patrones solapantes (Russ et al. 2021). También constataron que, entre las poblaciones dorsales, la expresión de genes relacionados con la plasticidad es más abundante, presumiblemente para favorecer procesos de sensibilización, mientras que entre las ventrales, lo es la expresión de genes involucrados en adhesión estructural y estabilidad, contribuyendo a la consistencia de los circuitos motores (Russ et al. 2021). Siguiendo esta estrategia, varios

estudios han obtenido resultados similares en humanos, donde las poblaciones dorsales son también más diversas y diferenciables que las ventrales (Yadav et al. 2023; Zhang et al. 2024).

Cada una de estas poblaciones de neuronas expresa unos marcadores específicos y que en algunos casos no son solapantes. Por ejemplo, dentro de la población excitatoria destacan las subpoblaciones que expresan neurotensina (NTS), SP, neuroquinina B (NKB), péptido liberador de gastrina (GRP), colecistoquinina (CKK) o neuropéptido FF (NPFF). Estas 6 subpoblaciones no solapantes suman el 75 % de todas las neuronas excitatorias en lámina II (Peirs et al. 2020). Otros marcadores de interneuronas excitatorias son la somatostatina (SOM), presente en el 19 y el 53 % de las neuronas excitatorias de lámina I y II respectivamente (Duan et al. 2014); la isoforma γ de la proteína quinasa C (PKC γ), exclusiva de neuronas excitatorias y muy abundante en la lámina II interna (Peirs et al. 2014); la calretinina (CR), expresada por el 40 % de las excitatorias en láminas I y II (y también en un 25 % de inhibitorias) (Gutierrez-Mecinas et al. 2019) o la encefalina (ENK), expresada por una mezcla de interneuronas excitatorias e inhibitorias (François et al. 2017). Estos cuatro marcadores se expresan ampliamente, y se superponen entre sí y con otras subpoblaciones (Fig. 9).

De la misma manera, en el caso de las interneuronas inhibitorias, se han encontrado 5 poblaciones no solapantes, clasificadas en función de la expresión de marcadores como galanina/dinorfina (GAL/DYN), neuropéptido Y (NPY), sintasa neuronal de óxido nítrico (NNOS), parvalbúmina (PV) y calretinina (CR). Estas poblaciones constituyen la práctica totalidad de las neuronas inhibitorias en las láminas I y II, aunque, con excepción de NPY, el resto de los marcadores también se han identificado en neuronas excitatorias (Fig. 9) (Peirs et al. 2020).

Esta identidad molecular también puede relacionarse con las características morfológicas, electrofisiológicas y ultraestructurales de las neuronas del asta dorsal. Por ejemplo, las células *islet* son siempre GABAérgicas, las radiales y la mayoría de las verticales son glutamatérgicas y las centrales pueden ser de ambos tipos (Yasaka et al. 2010). Respecto al patrón de disparo, el tónico es el más habitual en interneuronas inhibitorias mientras que el retrasado y el inicial son más frecuentes en excitatorias que en inhibitorias (Browne et al. 2020). A su vez, subpoblaciones concretas pueden disparar de manera homogénea, lo que sugiere una expresión similar de canales iónicos dependientes de voltaje. Por ejemplo, las poblaciones de interneuronas PKC γ^+ y SP $^+$ poseen un patrón retrasado, las GRP $^+$, uno inicial o simple y las PV $^+$, uno tónico (Abaira et al. 2017; Dickie et al. 2019). Al estudiar las sinapsis establecidas por distintas subpoblaciones de neuronas, se observa que las glutamatérgicas forman sinapsis axosomáticas, axodendríticas o axoespinales, mientras que las inhibitorias pueden formar axodendríticas o axosomáticas pero

también axoaxonales sobre los terminales centrales de aferentes sensoriales, con excepción de las fibras C peptidérgicas (Graham y Hughes 2020) (Fig. 9).

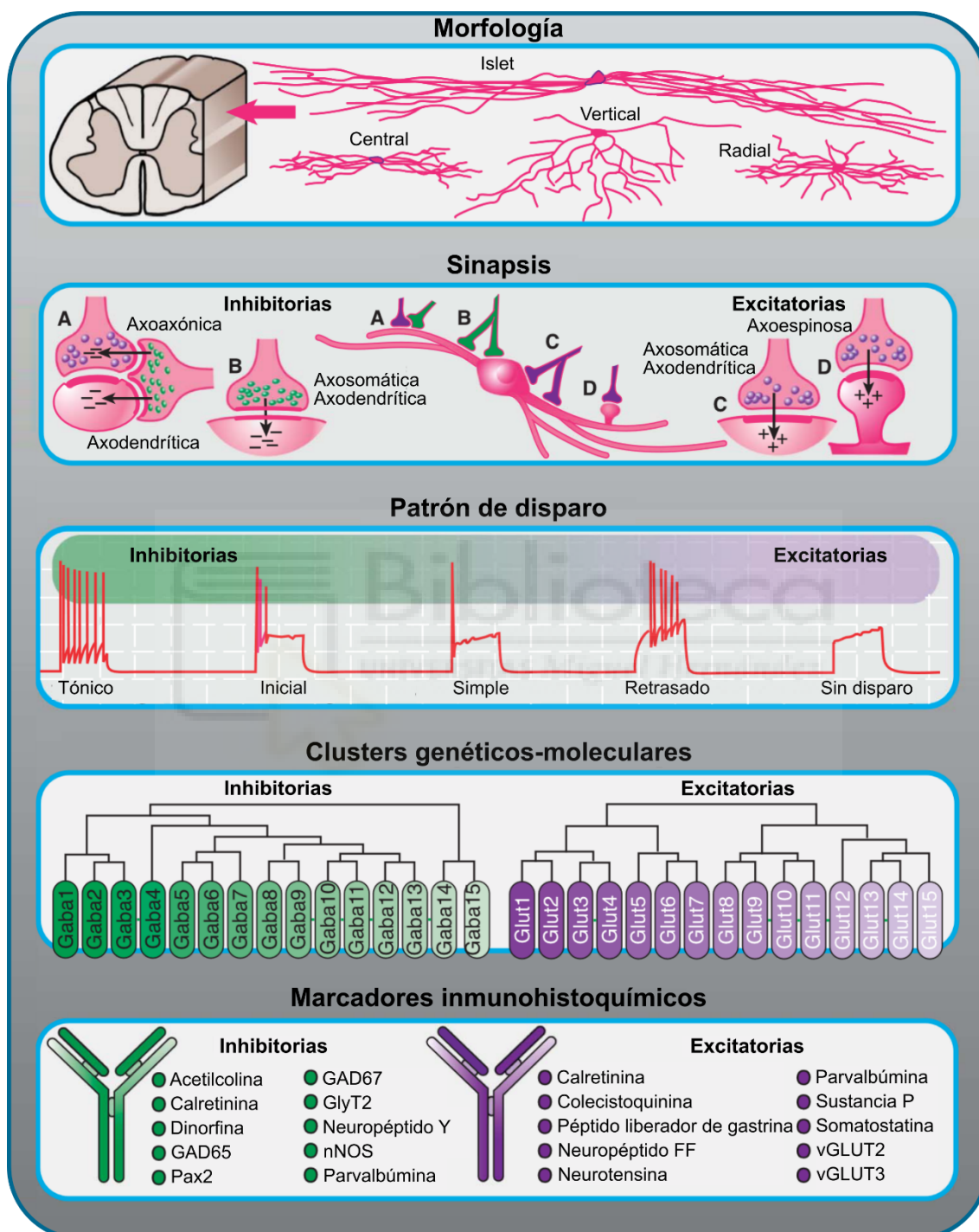


FIGURA 9. Clasificación de las interneuronas del asta dorsal de la médula espinal. Clasificación esquemática de los tipos de interneuronas en las láminas superficiales en función de su morfología, del tipo de sinapsis que establecen, del patrón de disparo de potenciales de acción tras la inyección de corriente, de la pertenencia a agrupaciones moleculares y de la expresión de marcadores inmunohistoquímicos. Modificado de Graham y Hughes 2020.

1.3.3. Funciones y adaptaciones de los circuitos espinales

Aunque se considera que la codificación periférica de la información sensorial puede ocurrir por una vía más o menos definida (línea marcada o “labeled line”), en la que las neuronas de una determinada población están asociadas a una submodalidad sensorial, esto no está tan claro en el caso de las neuronas de segundo y tercer orden de la médula espinal (Moayedi y Davis 2013). Un caso de “línea marcada” en la médula espinal puede estar representado por la vía del picor: las interneuronas excitatorias que expresan el receptor para GRP (GRPR) son necesarias para el procesamiento del picor inducido por pruritógenos químicos (Sun et al. 2009), y las que expresan urocortina 3 lo son para el procesamiento del picor mecánico (Pan et al. 2019). Al mismo tiempo, interneuronas inhibitorias, como las que expresan Bhlhb5 o dinorfina, se encargan de inhibir esta vía del picor (Ross et al. 2010; Huang et al. 2018). En otros casos, sin embargo, el procesamiento de una modalidad de estímulo requiere de la actividad conjunta de varias subpoblaciones neuronales, que a su vez participan en la codificación de estímulos de diferente naturaleza (Gatto et al. 2021).

Siguiendo esta idea, Melzack y Wall propusieron en 1965 su “teoría de la compuerta”, según la cual las células de la lámina II modulan la transmisión de la información desde las aferentes sensoriales hacia las neuronas de proyección. Las interneuronas ejercerían su actividad inhibitoria sobre la neurona de proyección cuando aumenta la actividad de las fibras A β , y cesan esa inhibición cuando se estimulan los nociceptores, facilitando la transmisión del dolor y produciendo la hipersensibilidad (Melzack y Wall 1965). Aunque esta presunción se ha aceptado universalmente, ahora sabemos que la organización neuronal y la circuitería de esta región medular poseen un grado de complejidad mucho más alto. Además, estos circuitos son cambiantes, sufriendo modificaciones en condiciones patológicas.

Uno de los casos más estudiados es el de la transmisión del dolor inducido por estimulación mecánica, y la hiperalgesia y alodinia mecánicas originadas en situaciones de inflamación o daño nervioso. Las interneuronas excitatorias SOM⁺ parecen jugar un papel importante en este proceso, ya que reciben inervación tanto de aferentes A δ /C como de A β , y conectan estos últimos mediante circuitos polisinápticos con las vías del dolor en situaciones patológicas (Duan et al. 2014). Dentro de esta población SOM⁺, encontramos las PKC γ ⁺ y las CR⁺, que parecen ser las encargadas del desarrollo de hipersensibilidad en modelos neuropáticos e inflamatorios, respectivamente (Malmberg et al. 1997; Peirs et al. 2021). Las interneuronas inhibitorias también juegan un papel decisivo en este proceso. Por ejemplo, las interneuronas PV⁺ inhiben a

las PKC γ^+ y, mediante sinapsis axoaxónicas, a las fibras A β , pero en modelos inflamatorios y neuropáticos su excitabilidad y por tanto su tono inhibitorio disminuye facilitando la transmisión dolorosa (Petitjean et al. 2015; Boyle et al. 2019). También ocurre con las NPY $^+$, que inhiben directamente a las neuronas de proyección de la lámina I y que ven reducida su actividad tras la lesión del nervio ciático, permitiendo que el tacto inocuo active las vías dolorosas (Tashima et al. 2021) (Fig. 10).



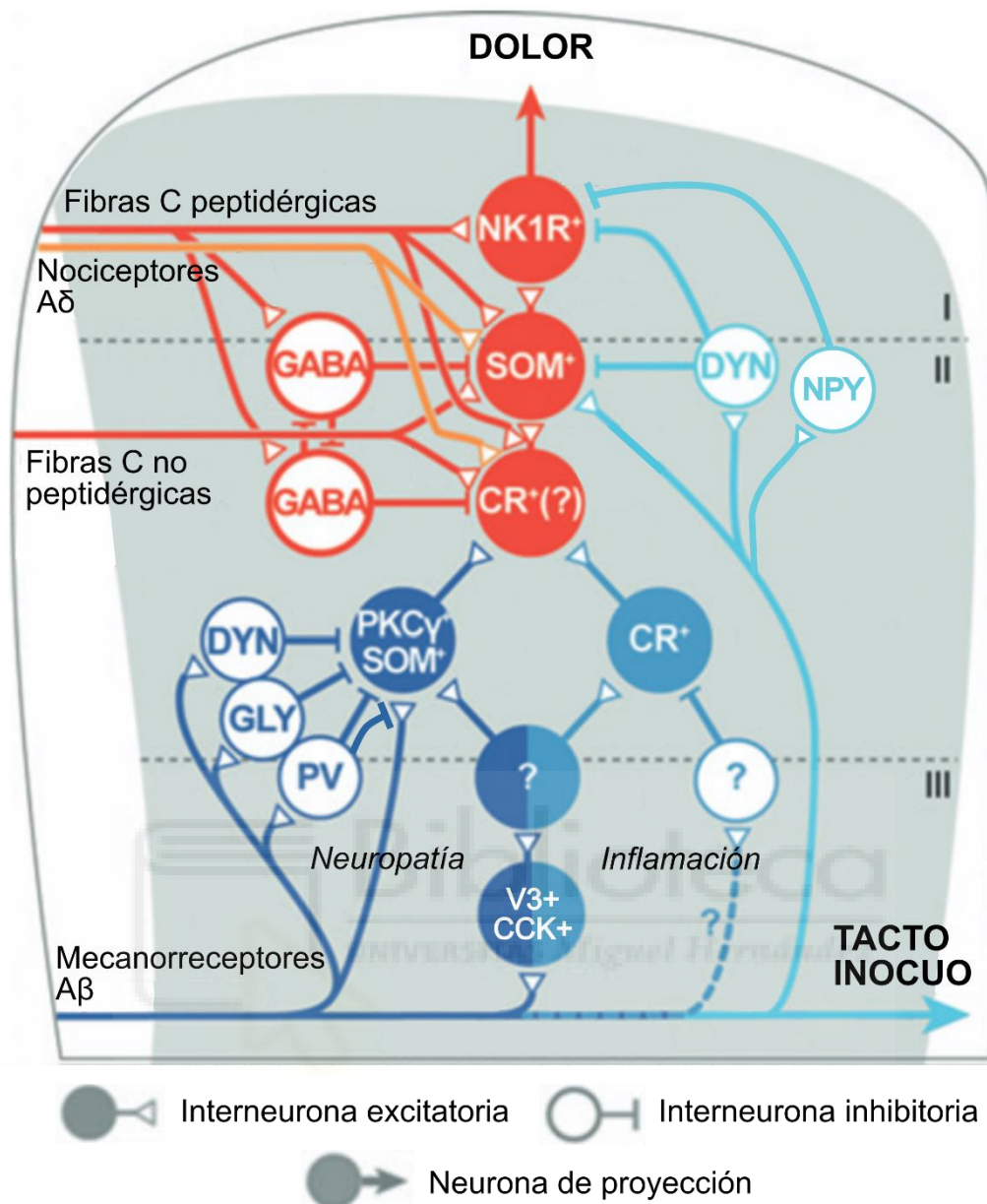


FIGURA 10. Representación esquemática de los circuitos en el asta dorsal de la médula espinal que facilitan la transmisión de dolor y la hipersensibilidad mecánica en condiciones patológicas. En rojo se muestran las vías y los circuitos para la transmisión de la información nociceptiva conducida por las fibras Aδ y C. A su llegada a las láminas superficiales de la médula espinal, hacen sinapsis tanto con neuronas de proyección (NK1R⁺) como con interneuronas excitatorias (SOM⁺) e inhibitorias. Por otro lado, los terminales mielínicos que conducen el tacto inocuo (en azul) establecen circuitos con varias subpoblaciones de interneuronas excitatorias e inhibitorias que, en condiciones de lesión neuropática o inflamatoria, pueden facilitar la transmisión sensorial hasta las láminas superficiales evocando sensaciones dolorosas. Modificado de [Lechner 2017](#), actualizado con datos de [Boyle et al. 2019](#); [Peirs et al. 2021](#) y [Tashima et al. 2021](#).

En cambio, los circuitos espinales encargados de la transmisión del calor nocivo y sus adaptaciones en contextos inflamatorios y neuropáticos son menos conocidos. Haring y colaboradores demostraron que la aplicación de pulsos de calor nocivo activaba interneuronas pertenecientes a 6 de las 15 agrupaciones o “clusters” excitatorias y a 5 de las 15 inhibitorias (Häring et al. 2018). La participación de las poblaciones neuronales descritas anteriormente en la codificación de estímulos mecánicos está sujeta a debate en el caso de los estímulos de calor nocivo; la mayoría de esas poblaciones no parecen participar de esta modalidad sensorial, con la excepción de las SOM⁺ y las NPY⁺. Además, la aplicación de calor nocivo parece reclutar otras poblaciones inhibitorias como las NNOS⁺ y galanina⁺ (Polgár, Sardella, et al. 2013; Christensen et al. 2016; Peirs et al. 2021). Recientemente, el trabajo de Wang y colaboradores arrojó luz sobre estos mecanismos centrales de procesamiento del calor nocivo, al descubrir que un porcentaje alto de las neuronas del asta dorsal que se activaban por calor eran positivas para el receptor tirosina quinasa ErbB4. Observaron que esta población de interneuronas excitatorias recibía sinapsis directas de los terminales TRPV1⁺, y su bloqueo disminuía la sensación de dolor térmico y la hiperalgesia térmica tras la inflamación (H. Wang et al. 2022), describiendo así un circuito para el procesamiento de estímulos de calor nocivo.

Sin embargo, el efecto que tiene la inflamación periférica sobre estos circuitos no está claro aún. Es necesario entender la contribución de las distintas subpoblaciones neuronales a la transmisión de información nociceptiva y los cambios que originan la hipersensibilidad en condiciones inflamatorias. Es por ello que el canal TRPA1 cobra especial relevancia, por su papel destacado en procesos inflamatorios y en la cronificación del dolor.

1.4. Marcadores de actividad

1.4.1. Genes de expresión temprana

La información sensorial se transmite hasta centros superiores mediante vías polisinápticas que involucran a varias poblaciones neuronales (Kemplay y Webster 1986), lo que dificulta el estudio e identificación de las neuronas implicadas en el proceso. Para ello, son particularmente relevantes los genes de expresión temprana (“Immediate Early Genes”), genes cuya expresión se induce rápidamente, minutos después de la actividad eléctrica o de la presentación de hormonas y factores de crecimiento, y cuyo producto es una proteína nuclear que afecta a la transcripción de genes implicados en proliferación, diferenciación y muerte celular (Sheng y

Greenberg 1990; Herrera y Robertson 1996). Entre ellos se encuentra el gen *cfos*, que, en el ámbito del sistema nervioso, se ha utilizado tradicionalmente para identificar poblaciones neuronales en el cerebro involucradas en procesos muy diversos de plasticidad sináptica, como la memoria (Sakaguchi y Hayashi 2012) o el miedo (Silva, Burns, y Gräff 2019), pero también en procesos como la actividad epiléptica (Morgan et al. 1987), la sed (Sagar, Sharp, y Curran 1988) o la actividad sexual (Robertson et al. 1991). También en la médula espinal se ha descrito la expresión de *cfos* en respuesta a los estímulos sensoriales. Hunt y colaboradores fueron los primeros que describieron un aumento de la expresión de este gen en neuronas del asta dorsal de la médula espinal tras la aplicación de estímulos nocivos en la extremidad posterior de ratas, como la inyección de agonistas de TRPA1 o la aplicación de altas temperaturas (Hunt, Pini, y Evan 1987). Posteriormente, Bullitt demostró que la estimulación mecánica nociva es también inductora de *cfos* en médula espinal, observando un aumento de su expresión en áreas cerebrales involucradas en el procesamiento del dolor, como el área parabraquial, algunos núcleos del tálamo y la amígdala (Bullitt 1990).

1.4.2. Sistemas reporteros basados en marcadores de actividad

Esta expresión temprana y transitoria ligada a actividad de los genes de expresión temprana ha constituido un punto de partida prometedor para diseñar herramientas genéticas que permitieran el marcaje permanente de células basándose en la actividad de esos genes de expresión temprana. Ya en 2007, Reijmers y colaboradores desarrollaron el sistema TetTag, en el que el transactivador dependiente de tetraciclina tTA está dirigido por un fragmento del promotor de *cfos*. Un segundo transgén dependiente de tTA se encuentra inhibido por la administración continua de doxiciclina, que cuando se retira permite la expresión continua del transgén en neuronas que expresan *cfos* en ese momento (Reijmers et al. 2007). Sin embargo, este sistema cuenta con ciertas limitaciones, como un nivel alto de expresión espuria del reportero, una ventana de tiempo amplia, delimitada por la retirada de doxiciclina, que reduce la resolución temporal y una expresión del reportero que, a partir de los 5 días, empieza a reducirse hasta que, a los 30, desaparece completamente (Reijmers et al. 2007; Liu et al. 2012). Es por ello que Guenther y colaboradores desarrollaron en 2013 la primera versión del ratón TRAP, un *knock-in* que utiliza elementos regulatorios de *cfos* para expresar la recombinasa CreERT2. En este caso, mientras *cfos* se esté expresando, es la administración de tamoxifeno la que permite la traslocación de la recombinasa al núcleo, donde desencadena la integración por

recombinación de un gen reportero con secuencias “STOP” flanqueadas por sitios loxP (“gen floxado”), lo que conduce a su expresión constitutiva (Guenther et al. 2013). Este “aTRAPamiento” se ha utilizado para la identificación de circuitos corticales y límbicos involucrados en el procesamiento de distintas categorías sensoriales, entre otras funciones (Guenther et al. 2013; Allen et al. 2017). Sin embargo, al ser un *knock in*, la expresión de *cfos* se ve truncada, lo que puede generar efectos no deseados (Watanabe et al. 1996; Deng et al. 1999). La segunda versión del ratón TRAP, el llamado TRAP2, supera esta limitación al no alterar la expresión endógena de *cfos*, al mismo tiempo que incorpora una recombinasa mejorada iCre (Shimshak et al. 2002), resultando en un aumento del número de neuronas “aTRAPadas” y en un mejor acceso a ciertas regiones cerebrales y espinales (Allen et al. 2017; DeNardo et al. 2019; Pham et al. 2020).







2. OBJETIVOS



OBJETIVO GENERAL

Identificar las redes neuronales nociceptivas establecidas por las neuronas sensoriales primarias y los cambios en estas redes que subyacen a la sensibilización asociada a los procesos inflamatorios.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la población de neuronas sensoriales que expresan el canal iónico TRPA1 y la identificación de sus dianas periféricas y centrales para su manipulación mediante herramientas optogenéticas.
2. Estudiar los circuitos de la médula espinal dorsal implicados en la transmisión de un estímulo nocivo en situaciones de dolor inflamatorio y examinar si estos circuitos se reactivan después de un estímulo inocuo en un contexto inflamatorio.







3. MATERIALES Y MÉTODOS



3.1. Animales

Para este estudio se utilizaron ratones macho y hembra de 1 a 4 meses de edad. Los procedimientos experimentales con animales se llevaron a cabo en el Instituto de Neurociencias (CSIC-UMH). Éstos se hicieron siguiendo las directrices del Real Decreto 53/2013 y de la directiva de la Comunidad Europea 2016/63/EU. Los procedimientos realizados en la Universidad de Rutgers (electrofisiología en rodajas de tejido y ensayos conductuales) fueron aprobados por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Rutgers. Los animales se criaron y permanecieron estabulados en condiciones de temperatura constante, ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y agua y comida *ad libitum*.

Para los experimentos de trazado de aferentes, los experimentos de conducta y los ensayos de expresión de la proteína cFos se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J (The Jackson Laboratory).

3.1.1. Línea transgénica TRPA1-Cre-ChR2

Para los experimentos de optogenética, se cruzaron ratones de la línea TRPA1-Cre, generada en el laboratorio del Dr. Mark Hoon (NIH, USA), con la línea transgénica reportera Ai32 (*Gt(ROSA)26Sor^{tm32(CAG-COP4*H134R/EYFP)Hze}/J*, The Jackson Laboratory, línea nº 012569), que expresa la proteína canalrodopsina-2 (ChR2) fusionada a EYFP cuando media recombinación dependiente de Cre. La ChR2 es una rodopsina con 7 dominios transmembrana que forman un canal catiónico, descubierto por primera vez en el alga *Chlamidomonas reinhardtii*. La absorción de un fotón abre el canal, permeando cationes mono y divalentes. Posee un máximo de absorción a 470 nm, y su expresión heteróloga en neuronas permite controlar de forma precisa su actividad mediante la aplicación de pulsos de luz (Sineshchekov, Jung, y Spudich 2002; Nagel et al. 2003; Boyden et al. 2005). A lo largo de este trabajo se denominará a este ratón como TRPA1-ChR2-EYFP.

3.1.2. Línea transgénica TRAP2-tdTomato

Para los experimentos de marcaje permanente de circuitos neuronales sensoriales en médula espinal se utilizaron ratones de la línea $Fos^{2A-iCreER}$ ($Fos^{tm2.1(icre/ERT2)Luo/J}$, The Jackson Laboratory, línea nº 030323), también conocida como línea TRAP2 por sus siglas en inglés *Targeted Recombination in Active Population* (recombinación dirigida en poblaciones activas) (Allen et al. 2017; DeNardo et al. 2019). Estos ratones expresan la recombinasa mejorada Cre (iCre) dirigida por el promotor del gen de expresión temprano *cfos*. La Cre permite la recombinación uniéndose a sitios LoxP, eliminando la secuencia STOP entre ellos y uniendo las mitades restantes. La traslocación de la recombinasa al núcleo para producir la recombinación está condicionada a la activación de un receptor de estrógenos (ERT2), al que está unida la Cre. Tanto el tamoxifeno como su metabolito, el 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT), activan este receptor (Feil et al. 1996). Así, la activación neuronal resulta en el inicio de la transcripción partiendo del promotor de *cfos*. Esto conduce a la expresión de la recombinasa, y la administración de 4-OHT permite la entrada de ésta al núcleo. Este modelo permite la expresión permanente de un reportero dependiente de Cre en las neuronas que estuvieron activas en una ventana de tiempo determinada por la administración intraperitoneal de 4-OHT. Para ello, este ratón se cruzó con la línea transgénica reportera Ai14 (B6.Cg-Gt(*ROSA*)26Sor^{tm14(CAG-tdTomato)Hze/J}, The Jackson Laboratory, línea nº 007914), que expresa la proteína fluorescente roja tdTomato cuando media recombinación dependiente de Cre (Fig. 10).

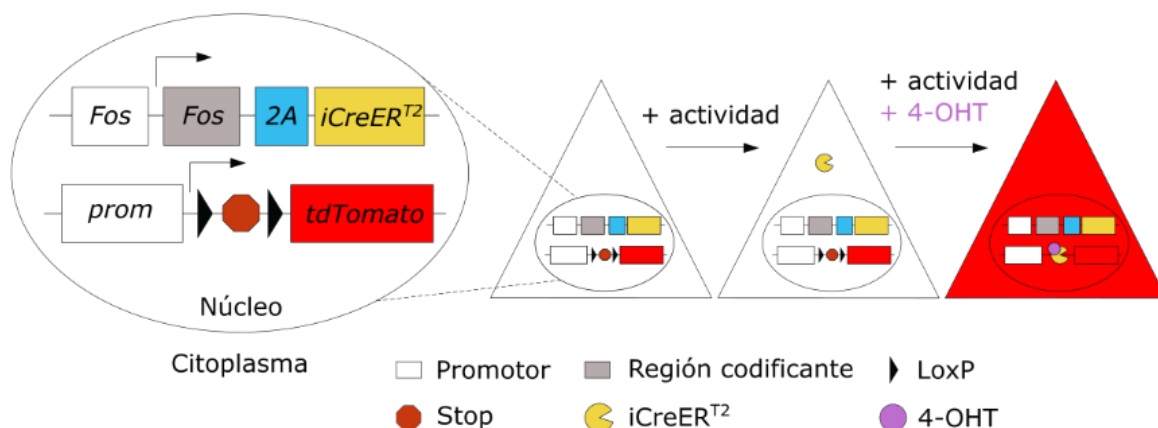


FIGURA 10: Esquema de la herramienta reportera TRAP2-tdTomato. Cuando en el núcleo de la neurona del ratón transgénico se encuentran los dos constructos, la actividad de esa neurona activa las regiones promotoras de *cfos*, permitiendo la expresión de *iCre*. *iCre* se mantiene en el citoplasma sin capacidad para inducir la recombinación hasta que la administración de 4-OHT permite su traslocación al núcleo. Ahí, la secuencia STOP se elimina permitiendo la expresión permanente del reportero *tdTomato*. Modificado de DeNardo et al. 2019.

3.2. Inducción del modelo inflamatorio y evaluación mediante test de conducta

Para evaluar el modelo inflamatorio se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J. Se administraron por vía intraplantar 10 µL de CFA (1 mg de *Mycobacterium Tuberculosis* por ml, Sigma, F5881) en el grupo experimental y 10 µl de suero fisiológico inyectable en el grupo control con ayuda de una jeringa de insulina (29G). La inyección se realizó siempre en la pata posterior izquierda, permaneciendo intacta la derecha en ambos grupos. El grosor de la pata se midió como indicador de la inflamación. Para ello se utilizó un micrómetro digital con el que se midió la distancia entre la palma y el dorso en la zona central de la pata.

3.2.1. Test de von Frey

Para evaluar la sensibilidad mecánica se aplicaron los pelos o filamentos de von Frey (Touch Test® Sensory Evaluators, NorthCoast Medical). Los experimentos se llevaron a cabo procurando

hacer al experimentador ciego al tratamiento, aunque la marcada inflamación de los animales inyectados con CFA lo dificultó. Los ratones se colocaron en cajas transparentes de metacrilato sobre una malla metálica con perforaciones de 5x5 mm. Los animales se aclimataron a la sala y a las cajas durante al menos una hora, los dos días previos al experimento, y al menos una hora antes de comenzar el ensayo. La prueba consistió en la aplicación de 10 filamentos de calibres crecientes sólo en la pata inyectada con CFA o con suero fisiológico (Tanga, Nutile-McMenemy, y DeLeo 2005). La fuerza ejercida por cada filamento se recoge en la Tabla 1. El filamento se aplicó de manera perpendicular a la superficie plantar a través de los agujeros de la malla hasta que se arqueaba, y se mantuvo en esa posición durante 2 segundos. Se consideró una respuesta positiva la retirada o desplazamiento de la pata durante ese tiempo. Cada uno de los 10 filamentos se aplicó 4 veces, registrando el porcentaje de respuestas positivas a cada pelo. Se comenzó con el filamento más fino, espaciando 2 minutos cada una de las 4 repeticiones, y pasando a continuación al filamento inmediatamente mayor hasta acabar la serie. Los machos y las hembras se testaron por separado y no se observaron diferencias significativas entre sexos. Se obtuvo la media del porcentaje de respuestas a cada filamento para cada grupo de ratones (control y CFA).

Tamaño	
Log(10*Fuerza(mg))	Fuerza (g)
2.36	0.02
2.44	0.04
2.83	0.07
3.22	0.16
3.61	0.4
3.84	0.6
4.08	1
4.17	1.4
4.31	2
4.56	4

Tabla 1. Filamentos de von Frey utilizados. Valores obtenidos de la casa comercial NorthCoast Medical.

3.2.2. Test de Hargreaves

Para evaluar la sensibilidad térmica, se empleó el test plantar de Hargreaves (IITC Life Science). Los ratones se colocaron en compartimentos transparentes de metacrilato sobre una placa de vidrio transparente elevada. Los animales se aclimataron a la sala y al habitáculo durante al menos una hora los dos días previos al experimento, y al menos una hora antes de comenzar el ensayo. El emisor de luz se colocó debajo del vidrio, generando un haz de luz visible que se enfocó sobre la superficie plantar de la pata inyectada, creando un punto caliente de 4x6 mm. La potencia se estableció al 40 % de la intensidad máxima posible. Se registró el tiempo que tardaba el ratón en retirar o mover la pata. El experimento finalizaba si el tiempo sin respuesta superaba los 20 segundos. Cada medida se repitió 3 veces en cada animal, dejando pasar al menos 2 minutos entre medidas, para obtener una media.

3.2.3. Rampa de calor en la placa caliente

Para medir el umbral de dolor térmico se empleó la técnica de la placa caliente. Se usó un equipo que consta de una placa metálica acoplada a un sistema Peltier (IITC Life Sciences). La placa se fijó a una temperatura inicial de 30 °C. El ratón se introdujo en un compartimento de metacrilato que tiene como suelo la placa metálica, permitiéndole moverse libremente en su interior, pero siempre apoyado sobre la placa. Se dejó aclimatar durante 5 minutos a la placa a 30 °C para después incrementar la temperatura a razón de 3 °C/minuto. Cuando el ratón exhibía comportamientos nocifensivos como saltar, retirar o lamerse las patas se detenía el experimento y se anotaba la temperatura a la que se iniciaban dichos comportamientos. El experimento finalizaba si la temperatura superaba los 52 °C.

3.3. Captura o marcaje permanente de circuitos

3.3.1. Preparación y administración de 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT)

Para inducir la recombinación en el ratón TRAP2-tdTomato, se administró una única dosis de 4-OHT intraperitoneal (≥ 70 % de isómero Z, Sigma H6278). Siguiendo las indicaciones del fabricante, la solución stock se preparó en etanol absoluto a una concentración de 20 mg/ml y

se conservó a -20 °C hasta pasados 6 meses. Para preparar la solución a inyectar, la solución stock se diluyó añadiendo 1 parte de Kolliphor®EL (Sigma C5135) como disolvente lipofílico y 2 partes de solución salina. A continuación, se centrifugó la solución en vacío a 1800 rpm y 12 mbar durante un mínimo de 20 minutos hasta evaporar todo el etanol. La solución final, a una concentración de 6.7 mg/ml, se inyectó por vía intraperitoneal a una dosis de 50 mg/kg. A los animales control se les inyectó una solución que contenía 1 parte de Kolliphor®EL y 2 partes de solución salina.

3.3.2. Estimulación y marcaje permanente de neuronas activas

Para inducir la recombinación en poblaciones neuronales activas tras la aplicación de un estímulo nocivo o no nocivo en ratones TRAP2-tdTomato, se inyectó intraperitonealmente el 4-OHT a una concentración de 50 mg/kg. Trabajos anteriores usando el ratón TRAP1 muestran que el número de neuronas marcadas con dosis de 50 o de 75 mg/kg de 4-OHT es significativamente mayor que con 25 mg/kg (Pham et al. 2020). Estos trabajos demuestran también que la administración de 4-OHT abre una ventana de tiempo de unas 6 horas, permitiendo la recombinación de neuronas que hubiesen estado activas hasta 3 horas antes y 3 horas después de la administración, pero mostrando un pico de efectividad en el marcaje si se realiza justo antes o justo después de la estimulación (DeNardo et al. 2019; Pham et al. 2020). Así, 15 minutos después de la inyección de 4-OHT, se aplicaron pulsos de calor de 10 segundos en la superficie plantar de la pata, a intervalos de 20 segundos. El pulso de calor se aplicó utilizando la misma placa metálica que se usó para medir el umbral de temperatura. El ratón se inmovilizó y se sujetó la pata trasera para colocar su superficie plantar sobre la placa, fijada a una temperatura de 42 o 52 °C, según el experimento. No se administró anestesia al aplicar los pulsos de calor. Para permitir la expresión completa del reportero, se estableció un período de espera de 7 días entre la aplicación del estímulo y el sacrificio del animal. (DeNardo et al. 2019; Naik et al. 2022) (Fig. 11). A lo largo de este manuscrito, se llamará “aTRAPamiento” al proceso de capturar las neuronas activas al dar un estímulo tras la administración de 4-OHT, y neuronas “aTRAPadas” a las que pasan a expresar el reportero permanentemente.

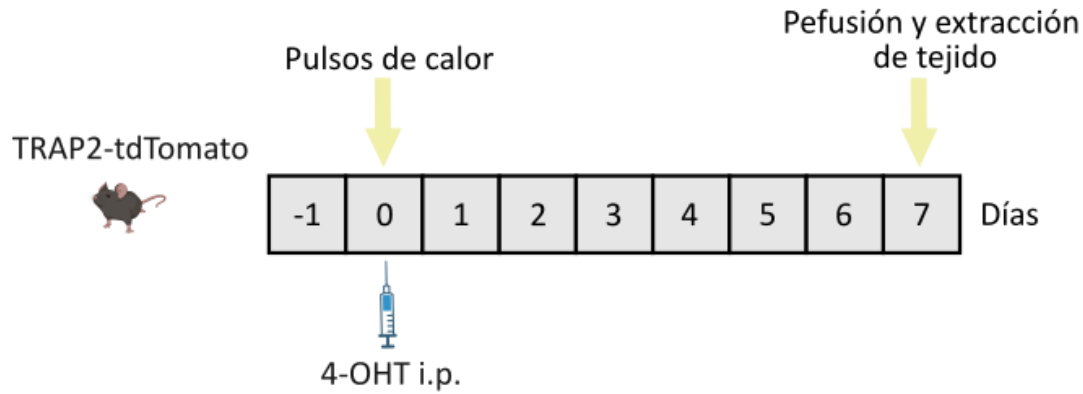


FIGURA 11. Protocolo general de captura o marcaje permanente de circuitos. A día 0, se aplicaron los pulsos de calor 15 minutos después de la administración intraperitoneal de 4-OHT, provocando el marcaje permanente de las neuronas activadas por la estimulación. El sacrificio se produjo 7 días tras el “aTRAPamiento” para permitir la completa expresión del reportero.

3.4. Registros electrofisiológicos en rodajas de médula espinal

Los registros se llevaron a cabo en ratones TRAP2-tdTomato que habían sido inyectados con solución salina o CFA y que al día siguiente habían sido sometidos a un protocolo de estimulación y “aTRAPamiento” siguiendo los pasos descritos en el apartado 3.3.2. Una semana después se decapitó el ratón, previamente anestesiado con isoflurano. Se retiró la columna vertebral y se extrajo la porción lumbar de la médula espinal, reconocible por la intumescencia lumbar. La porción extraída se pegó con pegamento a la pletina portamuestras de un vibratomo Leica VT1200S por su porción derecha, dejando hacia arriba la mitad izquierda y logrando así cortes en el plano sagital como se muestra en la Figura 12. Los cortes sagitales preservan mejor la estructura neuronal, pues muchas interneuronas extienden su árbol dendrítico en el plano rostro-caudal (Smith et al. 2015). La muestra se introdujo en la cubeta de corte, que se rellenó con líquido cefalorraquídeo artificial modificado (M-ACSF por sus siglas en inglés) frío y burbujeado con carbógeno (95 % O₂ y 5 % CO₂). Esta modificación consiste en la sustitución de NaCl por sacarosa, lo que reduce sustancialmente el daño celular que se produce durante el corte del tejido (Aghajanian y Rasmussen 1989). La cubeta se rodeó de solución con hielo para mantener el M-ACSF frío. Se obtuvieron rodajas de 200 µm de grosor que se incubaron 1 hora a 22-24 °C en una cámara que contenía M-ACSF burbujeado con carbógeno.

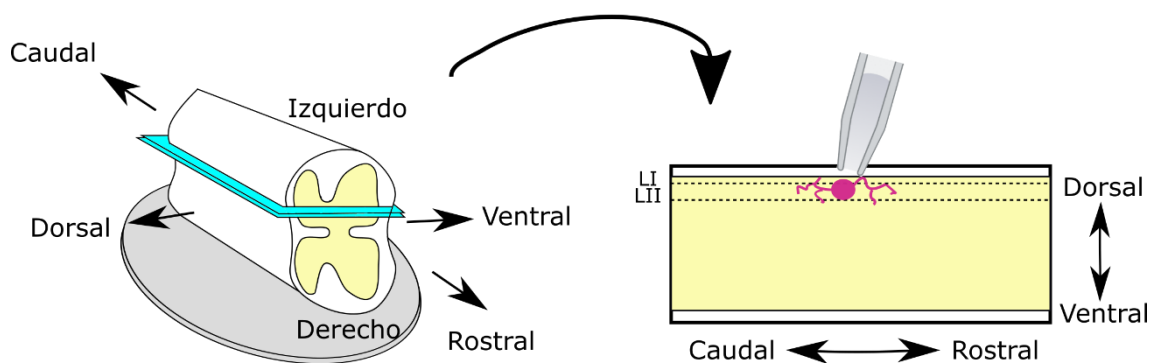


FIGURA 12. Colocación de la médula espinal. Orientación de la porción lumbar de la médula espinal en la platina de corte para la obtención de cortes sagitales para el registro electrofisiológico.

Las rodajas se transfirieron a una cámara de registro montada sobre un microscopio Zeiss Examiner.D1 con un objetivo Zeiss 40X Plan-Apochromat (Zeiss). El tejido se mantuvo continuamente perfundido con ACSF carbogenado a temperatura ambiente. La rodaja se inmovilizó en la base de la cámara gracias a una pequeña red, construida a partir de un alambre metálico en forma de U con hilos de nylon dispuestos como malla, que se coloca sobre ella. Las células se visualizaron con ayuda de una cámara Zeiss Axiocam 506 color y del software de imagen Zen 2.3 pro (Zeiss). La fluorescencia provenía de una lámpara X-Cite 120LED Boost (Excelitas Technologies). Se registraron neuronas en la región correspondiente a los niveles lumbares L4-L5 y en las láminas superficiales LI y especialmente LII del asta dorsal, donde se localizan las interneuronas que reciben inervación de las neuronas sensoriales que inervan la superficie plantar inyectada. Los niveles lumbares L4-L5 se identificaron por ser más gruesos que otros niveles medulares al recibir las proyecciones centrales de las neuronas que inervan las extremidades inferiores, y la lámina II se identificó por su aspecto más translucido al no contener fibras mielínicas y por su mayor densidad celular.

Se utilizaron micropipetas de vidrio borosilicato (diámetro externo de 1.5 mm, diámetro interno de 0.86 mm, Sutter Instruments) que se rellenaron con solución intracelular de gluconato de potasio, con una concentración iónica igual a la del citosol (Tabla 3), y que se conectaron a un amplificador MultiClamp 700B (Molecular Devices). Las corrientes y los voltajes se digitalizaron con una Digidata 1550B (Molecular Devices). La administración de estímulos y la adquisición de datos se llevó a cabo con el programa Clampex11.1 (Molecular Devices). La resistencia de las micropipetas osciló entre 4 y 8 MΩ, resistencia que se comprobó aplicando un pulso cuadrado de corriente cuando la pipeta se sumergió en el baño. La pipeta se acercó a la

membrana de una célula y se aplicó presión negativa mediante aspiración con la boca para formar un sello de una resistencia $> 1 \text{ G}\Omega$ entre la pipeta y la membrana. Así se alcanzó la configuración de célula adherida. Para obtener acceso al interior celular (configuración de célula entera), se aplicó un pulso de presión negativa para romper el parche de membrana. Se comprobó el acceso al citosol por la aparición de amplias corrientes capacitivas como consecuencia de la inyección del pulso cuadrado de corriente y la actuación de la membrana como capacitor.

Los registros se adquirieron en modo de fijación de voltaje (fijando el potencial de membrana a -70 mV) o de fijación de corriente (manteniendo el potencial de reposo a -60 mV). Después de establecer la configuración de célula entera, se calculó la resistencia en serie, la resistencia de entrada y la capacitancia de la membrana a partir de la respuesta a un pulso hiperpolarizante de 5 mV de 10 ms de duración. Estos valores se monitorizaron al principio y al final de cada registro y se descartaron las células cuyos valores cambiaran en más de un 30% . Para los registros de fijación de voltaje y corriente, la ganancia del amplificador se estableció en 5 , la señal se filtró a 10 kHz y la frecuencia de adquisición fue de 20 kHz .

Para el análisis de corrientes excitatorias postsinápticas espontáneas (sEPSCs), se obtuvieron registros continuos de al menos 2 minutos en modo de fijación de voltaje fijando el potencial de membrana a -70 mV y, sobre los registros obtenidos, se utilizó un método de detección basado en plantillas. En este método, se establecen unos parámetros para construir una plantilla (una función doble exponencial) de un evento sináptico típico que se pasa sobre el registro obtenido para detectar corrientes sinápticas de diferentes amplitudes que coincidan con la plantilla (Clements y Bekkers 1997). Primero se filtró la señal a 2 kHz y a continuación se creó una plantilla de 2 ms de línea basal, 15 ms de duración, -2 pA de amplitud, 1 ms de ascenso y 5 ms de caída. Se estableció una separación mínima entre eventos de 2 ms , y se detectaron todos los eventos que tenían lugar durante los primeros 100 segundos del registro. Se utilizó como umbral de respuestas una amplitud de 3 veces la desviación estándar de la línea basal, y se revisaron manualmente todos los eventos detectados. Se midieron tres variables para cada célula: la frecuencia, que corresponde al número de eventos medidos por segundo, la amplitud, que corresponde a la media de la amplitud de todos los eventos detectados en los 100 segundos, y la tau (τ) o constante de tiempo de inactivación, que indica el tiempo necesario para que la corriente alcance el 63.2% de la amplitud alcanzada tras la activación, y corresponde a la media de la tau de todos los eventos detectados en los 100 segundos.

3.4.1. Clasificación de neuronas según el patrón de disparo de potenciales de acción

El patrón de disparo de potenciales de acción de las neuronas registradas se caracterizó mediante la aplicación de series de pulsos despolarizantes de 1 segundo de duración, cada pulso con una amplitud 20 pA superior al anterior. Los patrones de disparo se dividieron en cuatro tipos (Browne et al. 2020) (Fig. 13):

- Tónico (T): se observan potenciales de acción continuos que se mantienen durante toda la inyección de corriente.
- Inicial (I): se observa un tren de potenciales de acción sólo al principio de la estimulación.
- Retrasado (R): se observa un claro intervalo de tiempo entre la inyección de corriente y el disparo del primer potencial de acción.
- Único (U): se observa un único potencial de acción al principio de la estimulación.

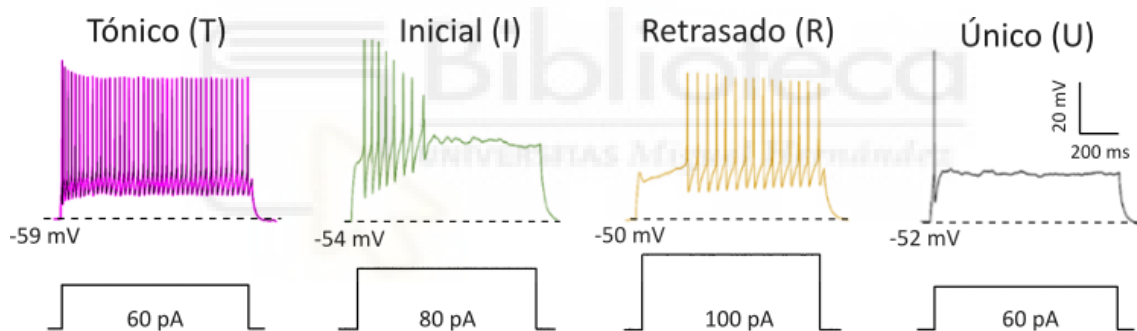


FIGURA 13: Clasificación de las interneuronas en función de sus patrones de disparo de potenciales de acción. Ejemplos representativos de los diferentes patrones de disparo de potenciales de acción tras la inyección de corriente en interneuronas del asta dorsal de la médula espinal.

3.5. Trazado retrógrado de terminales

3.5.1. Aferentes del estómago

Para identificar las poblaciones de neuronas sensoriales vagales que inervan la pared del estómago, se utilizó el trazador lipofílico fluorescente Dil (DiI18(3), Thermo Fisher Scientific

D3911), que presenta una excitación máxima a 549 nm y difunde por la membrana plasmática de las neuronas permitiendo su marcaje anterógrado y retrógrado (Honig y Hume 1986; Godement et al. 1987). Se preparó un stock de Dil al 10 % en DMSO y una solución de trabajo al 0.5 o 1 % diluida en solución salina. Los ratones se anestesiaron durante 2 – 3 minutos con isoflurano y recibieron una inyección subcutánea de buprenorfina (0.1 mg/kg). Después se realizó una laparotomía para exponer el estómago. Se hicieron 10 inyecciones por cada ratón, 5 en la cara ventral y 5 en la cara dorsal del estómago, de 0.25 µL de Dil cada una, con una jeringa Hamilton de 5 µL. La incisión se suturó internamente con hilo absorbible del nº 6 y externamente con cierres de sutura Michel. Los ratones se alojaron en sus jaulas después de la cirugía y recibieron paracetamol oral durante 2-4 días. por vial oral. De 3 a 7 días después, se procedió a su sacrificio para la obtención de tejidos.

3.5.2. Aferentes de la superficie plantar

Para identificar las poblaciones de neuronas sensoriales de los ganglios raquídeos que inervan la superficie plantar se utilizó un conjugado de aglutinina del germen de trigo con Alexa Fluor™ 594 (WGA AF594, Thermo Fisher Scientific W11262), una lectina con alta afinidad por glicoproteínas que se utiliza como trazador anterógrado y retrógrado y que presenta un máximo de excitación en 590 nm. Se preparó una disolución de WGA al 0.5 % en PBS 1x. Los ratones se inmovilizaron y se les inyectó 10 µL de WGA en la región intraplantar de una de las patas posteriores con ayuda de una jeringa de insulina (29G). Siempre se inyectó en la pata izquierda. Los ratones se alojaron en sus jaulas y se dejaron pasar 3 días hasta el sacrificio y la obtención de tejidos.

3.6. Aislamiento y cultivo de neuronas de los ganglios de la raíz dorsal y de los ganglios vagales

Para el cultivo de neuronas de los DRG, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical seguida de decapitación para confirmar la muerte. Se extrajo la columna vertebral y bajo una lupa estereoscópica se extrajeron los DRG. Para identificar, en caso de ser necesario, los DRG lumbares, se tomó como referencia la última costilla, que se inserta en el espacio entre las vértebras torácicas 12 y 13. A partir de ahí se contaron las vértebras y se localizaron los ganglios

correspondientes de L1 a L5 (Fig. 14.A). Para los ganglios vagales (VG), el ratón se sacrificó por inhalación de CO₂ y se seccionó el corazón para confirmar la muerte. Bajo una lupa estereoscópica se cortó la piel del cuello en su porción ventral y se retiró el músculo omohioideo para exponer la tráquea. Se abrieron los músculos esternocleidomastoideo y digástrico posterior para acceder al nervio vago. El nervio se separó del tejido conectivo que lo rodea y se siguió su prolongación central hasta que se alcanzaron los ganglios vagales, que se cortaron en su porción rostral y caudal (Fig. 14.B). Tanto los VG como los DRG se procesaron siguiendo el mismo protocolo. Se depositaron sobre una placa Petri con solución fría de HBSS (Hank's Balance Salt Solution) sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ (GIBCO™, 14170-088). A continuación, se limpiaron de tejido conectivo, se axotomizaron y se incubaron en una solución enzimática de 900 U/ml de colagenasa tipo XI (Sigma, C7657) y 5.31 U/ml de dispasa II (GIBCO, 17105-041) en solución INCMix (Tabla 3) durante 45-60 minutos a 37 °C con 5 % de CO₂. Tras la disociación enzimática, se añadió 1 ml de medio HBSS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ suplementado con 5 % de suero bovino fetal (FBS, GIBCO™, 16000-044), 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina (Gibco™, PL15140122) y 1 % de solución de vitaminas MEM (Gibco™11120-037). En ese medio, los ganglios se disociaron mecánicamente resuspendiéndolos con una punta de pipeta de 1 ml realizando 10 pases. La suspensión de células se pasó por un filtro de nylon con un tamaño de poro de 70 µm (Falcon) y se centrifugó a 300 g durante 5 minutos. En el caso de los DRG, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en Minimum Essential Medium (MEM, Gibco™11095-080) suplementado con 5 % de FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina y 1 % de MEM-vit. En el caso de los VG se eliminó todo el sobrenadante posible y se resuspendieron las células en el medio restante. En ambos casos las neuronas se sembraron sobre cristales tratados previamente con poli-L-lisina al 0.01 % (Sigma, P4707). Los cristales usados (Menzel-Gläser, grosor nº 1) tenían 6 mm de diámetro para los experimentos de optogenética in vitro y de 12 mm de diámetro para los experimentos de trazado de aferentes. Una vez sembradas, las neuronas se incubaron durante al menos 2 horas para permitir la adhesión al vidrio, y después se añadió medio MEM suplementado con 5 % de FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina y 1 % de solución de vitaminas MEM hasta cubrir toda la placa. Los experimentos de imagen de calcio se llevaron a cabo de 4 a 24 horas tras la siembra.

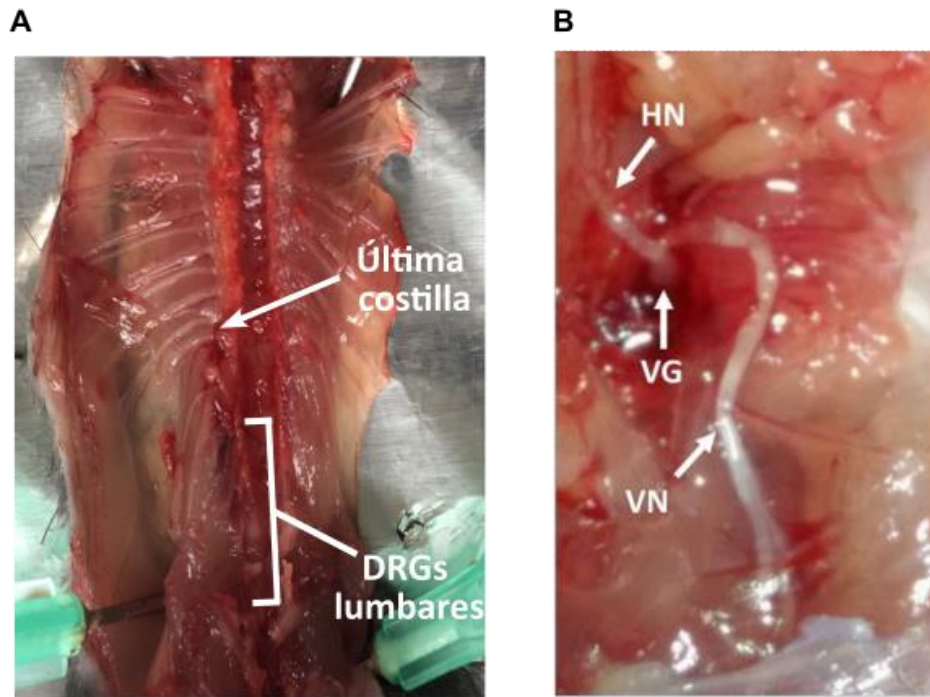


FIGURA 14. Disección de los ganglios raquídeos y vagales. (A): Tras extraer la columna vertebral y retirar la médula espinal, se descubren los forámenes intervertebrales, en los que se localizan los DRG. Se utiliza la última costilla como referencia, el primer ganglio que se encuentra por debajo de ella es T13 y a partir de ahí se localizan los ganglios lumbares. (B): Tras abrir la piel del cuello y los músculos de la zona, se expone el nervio vago (VN) y el hipogloso (HN). El ganglio vagal aparece como un engrosamiento del nervio vago. Imagen tomada de la figura 11 de la tesis doctoral de Katerina Gers-Barlag (2020).

3.7. Imagen de calcio intracelular mediante fluorescencia

La caracterización funcional mediante imagen de calcio se llevó a cabo utilizando el indicador de calcio fluorescente Fura-2 acetoximetil ester (Fura-2AM, Thermo Fisher Scientific 1221). En el citoplasma, esta molécula se une a iones de calcio intracelular. A bajas concentraciones de calcio intracelular, el indicador Fura-2AM alcanza un máximo de excitación a una longitud de onda de alrededor de 380 nm. Cuando la concentración de calcio aumenta por entrada desde el exterior o por liberación de los depósitos, esos iones se unen al Fura-2AM y su máximo de excitación se desplaza a longitudes de onda más cortas, de alrededor de 340 nm (Grynkiewicz, Poenie, y Tsien 1985) (Fig. 15). Excitando a esas dos longitudes de onda, la razón entre la fluorescencia emitida tras excitación a 340 nm y la emitida tras excitación a 380 nm será

proporcional a la concentración de calcio intracelular. Esta razón (F340/F380) es la que se utiliza en este trabajo como indicadora de la concentración del calcio intracelular.

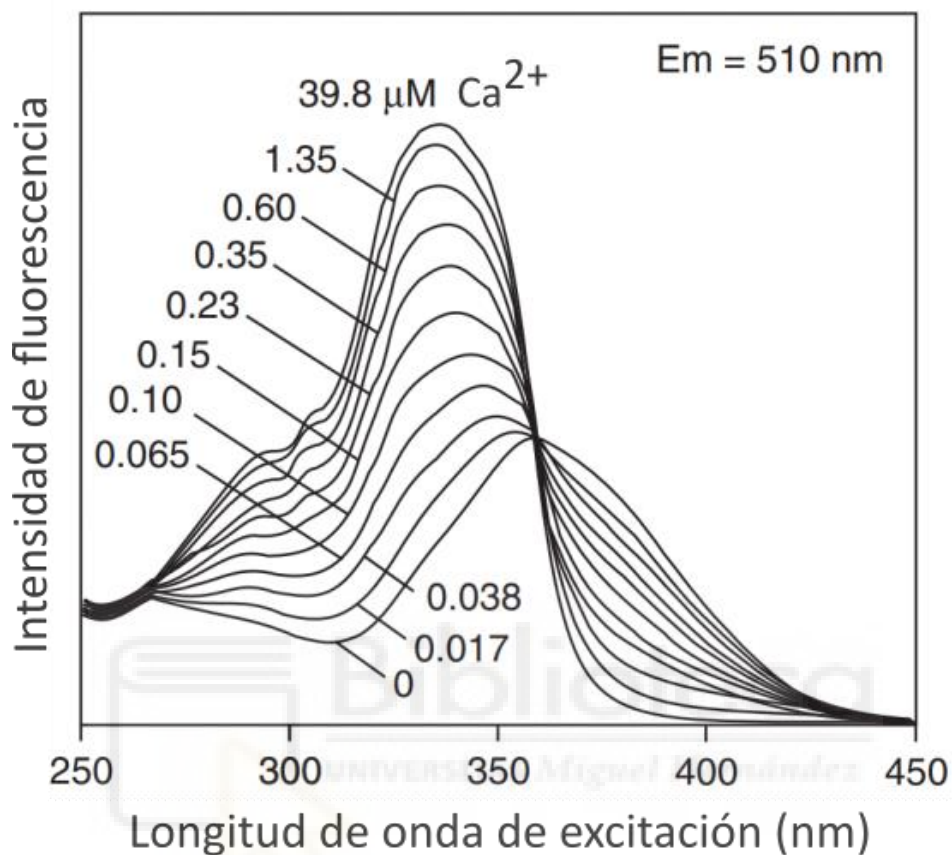


FIGURA 15. Espectro de excitación de la molécula Fura-2AM en soluciones que contienen desde 0 hasta 39.8 μM de Ca^{2+} libre. Modificado de las especificaciones del producto Fura-2AM (Thermo Fisher Scientific 1221).

El cristal portaobjetos con las células se incubó durante al menos 45 minutos y a 37 °C en una solución de 5 μM de Fura-2AM y 400 ng/ml de Pluronic™ F-127 (Thermo Fisher Scientific P6867), un surfactante que favorece la incorporación de Fura-2AM al interior celular (Hamad, Krause, y Wahle 2015). Finalizada la incubación, se colocó el cristal en una cámara de registro perfundida con solución extracelular con un flujo de 1 ml/min, y montada sobre un microscopio de fluorescencia invertido Leica (Leica DMI 3000B, Leica Microsystems). La composición de la solución extracelular se detalla en la Tabla 3. La solución se mantuvo a una temperatura constante de 32-34 °C usando un sistema Peltier refrigerado por agua y controlado por un sistema de retroalimentación. La temperatura se registró gracias a una sonda de temperatura Physitemp (Physitemp Instruments, modelo BAT-12) colocada lo más cerca posible del campo

registrado, conectada a un digitalizador Axon Digidata (Molecular Devices, 1440A converter para los experimentos de trazado de aferentes y 1322AD converter para los experimentos de optogenética in vitro) y controlada por el software pClamp10 (Molecular Devices).

Para los experimentos de trazado de aferentes, el microscopio utilizado fue un Nikon Eclipse TE2000-U con un objetivo Nikon 20x S Fluor (NA 0.75, Nikon) y acoplado a una cámara Andor 888 (Oxford Instruments). El Fura-2AM se excitó a longitudes de onda de 340 y 380 nm con un monocromador Polychrome V (TILL Photonics), tomando una foto en ambas longitudes de onda cada segundo y mostrando en tiempo real las ratios de intensidad de fluorescencia (F340/F380) gracias al software Life Acquisition (FEI Munich GmbH). Antes de iniciar cualquier experimento, se tomó una foto del campo con luz transmitida, y otra foto excitando a una longitud de onda de 550 nm para identificar las neuronas que hubieran captado el trazador fluorescente Dil.

Para los experimentos de registro optogenético, el microscopio utilizado fue un Leica DMI 3000B (Leica Microsystems) con un objetivo de inmersión en agua 20x y acoplado a una cámara Orca ER CCD (Hamamatsu Photonics). El Fura-2AM se excitó a longitudes de onda de 340 y 380 nm usando una rueda de filtros Lambda 10-2 y una lámpara de xenón Lambda LS (Sutter Instruments). La fluorescencia emitida se filtró con un filtro de paso de longitud de onda larga de 510 nm. Se tomó una foto en ambas longitudes de onda cada 3 segundos mostrándose en tiempo real las ratios de intensidad de fluorescencia (F340/F380) usando el software MetaFluor (Molecular Devices). Antes de iniciar cualquier experimento, se tomó una foto del campo con luz transmitida, y otra foto excitando a una longitud de onda de 488 nm para identificar las neuronas Chr2-EYFP⁺.

En ambos casos, se usó la imagen de luz transmitida para definir manualmente las regiones de interés (ROIs), delimitando células con aspecto de neuronas sensoriales. Los estímulos químicos que se aplicaron consistieron en la perfusión de diferentes agonistas sin interrupción del flujo. Las soluciones utilizadas se prepararon el mismo día del experimento y se recogen en la Tabla 4. Al final de cada experimento se aplicó un pulso de cloruro de potasio (KCl 30 o 50 mM) para comprobar la viabilidad de las células. Se consideró una respuesta positiva si el incremento en la ratio de fluorescencia tras la aplicación del estímulo era mayor de 0.05 u.a.

3.8. Estimulación optogenética

Para estudiar la activación de las neuronas sensoriales TRPA1⁺ en el modelo de ratón transgénico TRPA1-ChR2-EYFP y su correlato conductual, se utilizó una fibra óptica con una fuente de luz LED colimada de 470 nm para aplicar los pulsos de luz. Se conectó a un controlador (Ultra-High-Power LED Controller) y se utilizó un generador de pulsos TTL programable PulserPlus (Prizmatix), configurando la frecuencia y duración de estos pulsos con el programa PulserPlus Software (Prizmatix). La potencia se reguló desde el controlador, y se midieron las equivalencias de los valores relativos con la irradiancia en mW/cm² usando un luxómetro. Las equivalencias se muestran en la Tabla 2.

Intensidad relativa (%)	Irradiancia (mW/cm ²)
20	33
40	61
60	74
80	95
100	111

TABLA 2: Equivalencias de las intensidades relativas de luz y la irradiancia generadas por el LED.

3.8.1. Imagen de calcio intracelular durante estimulación óptica

Para confirmar la activación selectiva por luz de las neuronas TRPA1⁺, se llevaron a cabo experimentos de imagen de calcio en neuronas disociadas de los DRG del ratón TRPA1-ChR2-EYFP. Los detalles de la técnica de imagen de calcio se han descrito en una sección anterior. Además de los estímulos ópticos, que consistieron en la iluminación con pulsos de luz azul sobre las células, se aplicaron estímulos químicos para activar a las neuronas de forma fisiológica. La fibra óptica se colocó lo más cercana posible del campo registrado en la cámara de registro, pero sin sumergirse en la solución. El protocolo de estimulación consistió en la aplicación de pulsos de luz de 10 ms durante 2 segundos, a una frecuencia de 5, 10 o 20 Hz. La intensidad de luz se estableció al 100%.

3.8.2. Electrofisiología en neuronas disociadas tras iluminación con luz pulsante

Para identificar corrientes de acción generadas por la aplicación de pulsos de luz en neuronas disociadas de los DRG que expresaban la canalrodopsina-2, se llevaron a cabo experimentos funcionales de “patch-clamp” en configuración de célula adherida (ver apartado 3.5). Esta configuración permite registrar la actividad de la célula sin romper la membrana, permitiendo sellos holgados y registros estables en el tiempo (Perkins 2006) (Fig. 16.A).

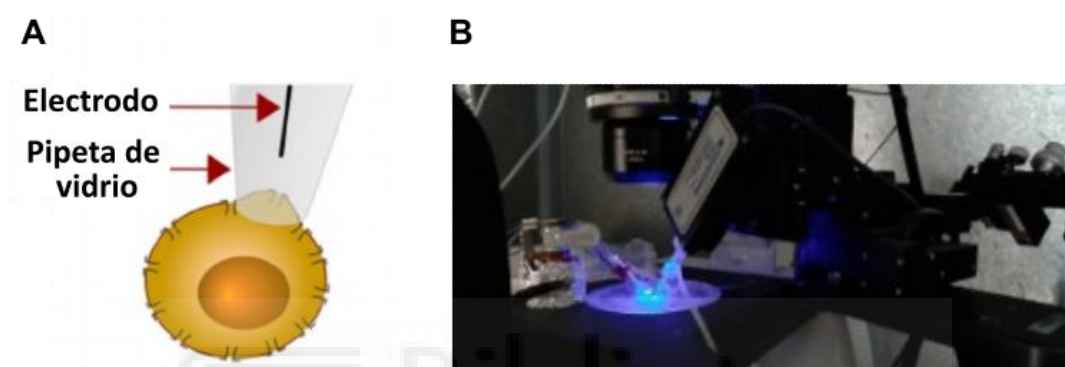


FIGURA 16. Registro electrofisiológico en configuración de célula adherida de neuronas TRPA1⁺ disociadas. (A): La pipeta de vidrio se puso en contacto con la membrana celular y se aplicó presión negativa para la formación de un sello. El electrodo en el interior de la pipeta permite el registro de la actividad eléctrica. (B): Estación de registro electrofisiológico, con el electrodo de registro y la fibra óptica de estimulación con luz.

El cristal con las neuronas se colocó en una cámara de registro montada sobre un microscopio Leica DMI 3000B (Leica Microsystems) con un objetivo de inmersión en aceite 40X y acoplado a una cámara Orca ER CCD (Hamamatsu Photonics). Las células estuvieron continuamente perfundidas con solución extracelular que se mantuvo a una temperatura constante de 32-34 °C usando un sistema Peltier refrigerado por agua y controlado por un sistema de retroalimentación. La temperatura se registró con una sonda de temperatura Physitemp (Physitemp Instruments, modelo BAT-12) colocada lo más cerca posible del campo registrado, conectada a un digitalizador Axon Digidata 1440A (Molecular Devices) y controlada por el software pClamp10 (Molecular Devices). Las células ChR2-EYFP⁺ se excitaron a 485 nm utilizando una rueda de filtros Lambda 10-2 (Sutter Instruments) y una lámpara de xenón Lambda LS (Sutter Instruments). La fluorescencia emitida se filtró a 525/50 nm y la imagen se visualizó usando el software MetaFluor (Molecular Devices). Las micropipetas, con resistencias

de 3 a 7 M Ω , se rellenaron con solución extracelular, simulando las condiciones extracelulares (ya que en esa configuración no se accede al interior de la célula; Tabla 3), y se conectaron a un amplificador MultiClamp 700B (Molecular Devices) y a la Digidata. La configuración de célula adherida se logró como se describe en el apartado 3.5 (Fig. 16.A).

Se utilizó la fuente de luz azul descrita anteriormente en este mismo apartado, y se aplicó el mismo protocolo de estimulación usado en los experimentos de imagen de calcio (Fig. 16.B). Las corrientes inducidas por los pulsos de luz se registraron en el modo de fijación de voltaje a un potencial de membrana de 0 mV; la ganancia del amplificador se estableció en 5, la señal se filtró a 2 KHz y la frecuencia de adquisición fue de 20 KHz.

3.8.3. Comportamiento nocifensivo

Para evaluar la respuesta conductual de los ratones TRPA1-ChR2-EYFP a la aplicación de pulsos de luz, se colocó al ratón en una plataforma de vidrio transparente elevada de 18 x 18 cm y cerrada en su perímetro por paredes de metacrilato. Los animales se aclimataron a la plataforma y a la sala durante al menos 1 hora el día previo al experimento y al menos una hora antes el día del ensayo. El experimento consistió en acercar el extremo de la fibra óptica a la superficie plantar por debajo, iluminando la pata a través de la plataforma de vidrio con varias intensidades (del 2 al 100 % de la intensidad máxima generada por el controlador) y frecuencias (5 y 10 Hz) de luz pulsante. La duración de los pulsos de luz fue de 20 ms y se aplicaron durante 20 segundos. Este protocolo se repitió tres veces por ratón y por condición de intensidad y frecuencia, alternando la pata derecha con la izquierda. El experimento se grabó con un móvil Xiaomi Mi A1 y, durante el visionado posterior, se evaluó el porcentaje de ensayos en los que se observaron los comportamientos de retirada de la pata, retracción sostenida de la pata y lamida de la pata. También se midió el número de veces que el ratón retiró la pata y la duración de la retracción y lamida en cada prueba.

3.9. Inmunohistoquímica

3.9.1. Procesamiento de tejidos: ganglios raquídeos

La extracción de los DRG del ratón TRPA1-ChR2-EYFP para realizar la inmunohistoquímica se llevó a cabo inmediatamente después de extraer los DRG para cultivos primarios (ver apartado 3.6). La mitad de los DRG de un mismo ratón se utilizaron para realizar cultivos de neuronas disociadas y la otra mitad se fijaron en paraformaldehído (PFA, Scharlau PA0095) al 4 % en PBS 1x durante 2 horas a 4 °C. A continuación, se lavaron con PBS 1x y se criopreservaron en una solución de sacarosa (Sigma S0389) al 30 % en PBS 1x durante al menos 12 horas a 4 °C. Se embebieron en medio de inmersión para cortes criogénicos (OCT, Sakura 4583) y se cortaron en un criostato MNT (SLEE Medical) a 20 µm de grosor. Los cortes se adhirieron a portas de adhesión Superfrost (Thermo Fisher Scientific 12312148) y se conservaron a 4 °C hasta su uso.

3.9.2. Procesamiento de tejidos: médula espinal

Para la cuantificación de poblaciones neuronales activas en médula espinal tras la aplicación de un estímulo se tomó como marcador la proteína cFos. Para fijar el tejido en el pico máximo de expresión de la proteína, los ratones se anestesiaron con pentobarbital sódico (Dolethal®, Vetoquinol 07400060) a una dosis de 70 mg/kg 2 horas después de haber aplicado la estimulación periférica, ya sea con luz pulsante en el ratón TRPA1-ChR2-EYFP o calor radiante en los ratones TRAP2-tdTomato o C57BL/6. Una vez comprobada la ausencia de los reflejos palpebral o interdigital, se abrió la caja torácica, se introdujo una cánula en el ventrículo izquierdo y se practicó una pequeña incisión en la aurícula derecha. Con ayuda de una bomba peristáltica, se hizo pasar PBS 1x frío a una velocidad de 5 ml/min durante 10 minutos para eliminar la sangre del sistema circulatorio y a continuación se perfundió con PFA al 4 % frío durante otros 10 minutos para conseguir la fijación. Se extrajo en bloque la columna vertebral, se practicó una laminectomía en la porción dorsal y se extrajo la médula espinal en su porción lumbar, siendo estos segmentos reconocibles gracias a las referencias anatómicas de vértebras y costillas (Fig. 17).

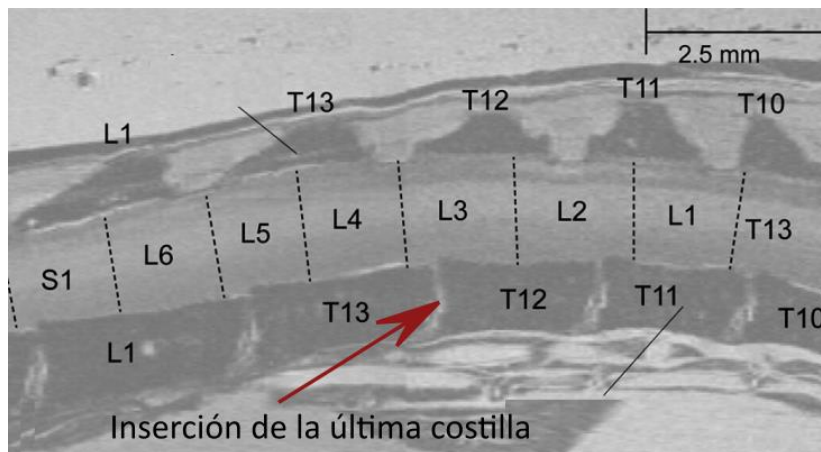


FIGURA 17. Referencias anatómicas para la extracción de la porción lumbar de la médula espinal. Referencias anatómicas para reconocer los niveles medulares lumbares. Se identifican las dos vértebras T12 y T13, entre las que se inserta la costilla más caudal. Se extrae la porción de médula espinal que se encuentra entre las dos vértebras adyacentes a estas, las T11 y L1, para asegurar todos los niveles lumbares. Modificado de [Harrison et al. 2013](#).

Para la postfijación, se introdujo el tejido en PFA al 4 % durante 2 horas a 4 °C. Después se lavó con PBS 1x y se criopreservó en solución de sacarosa al 30 % en PBS 1x durante al menos 12 horas a 4 °C. Se embebió en medio de inmersión para cortes criogénicos y se cortó en el criostato MNT (SLEE Medical) a 30 µm de grosor. La orientación del tejido en el porta fue siempre la misma para asegurar el reconocimiento de las regiones dorsal, ventral, izquierda y derecha de cada rodaja. Los cortes se adhirieron a portas de adhesión Superfrost y se conservaron a 4 °C hasta su uso. Para la cuantificación de poblaciones activas en médula espinal tras la aplicación de un estímulo se usó como marcador la proteína cFos.

3.9.3. Protocolo de inmunohistoquímica

Se empleó el mismo protocolo de inmunohistoquímica para rodajas de DRG y de médula espinal. Las rodajas se secaron en una estufa a 37 °C durante 30 minutos y a continuación se lavaron 2 veces con PB 0.1 M con Tween 20 al 0.5 % (PBT). Para bloquear sitios de unión inespecífica de los anticuerpos, se incubaron las rodajas a temperatura ambiente durante 1 hora con una solución de bloqueo que contenía una alta concentración de proteínas. Esta solución se preparó diluyendo albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés, Tocris 5217) al 5 % y Triton X-100 (Sigma 11332481001) al 1 % en PBT. A continuación, se diluyeron los anticuerpos primarios en solución de bloqueo y los cortes se incubaron con el anticuerpo primario a 4 °C

durante la noche. Al día siguiente, las rodajas se lavaron con PBT 4 veces durante 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo durante 45 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados y sus diluciones se recogen en la Tabla 5. A partir de la incubación con el anticuerpo secundario los cortes fueron protegidos de la exposición a la luz. Los cortes se lavaron de nuevo 4 veces durante 10 minutos con PBT, una vez durante 10 minutos con PBS 1x, y tras dejarlos secar unos minutos se montaron con la solución acuosa Fluoromount™ (Sigma, F4680). Una vez el medio de montaje se secó, se selló el cubreobjetos con esmalte de uñas transparente.

3.10. Adquisición y procesamiento de imágenes

Para la identificación de los niveles medulares de cada corte de médula espinal, se tomaron imágenes de todo el portaobjetos en un microscopio Zeiss AxioScan Z1 (Zeiss) con un objetivo de 20x. Esto permitió mapear toda la preparación y, con ayuda de un atlas de médula espinal de ratón (Watson et al. 2009), reconocer por su morfología a qué segmento lumbar pertenecía cada corte. Una vez reconocidos los cortes de interés, se tomaron imágenes de microscopía de fluorescencia en un microscopio confocal Olympus FV1200 (Olympus) con el objetivo de 20x de inmersión en aceite y el software FV10-ASW. Las imágenes se tomaron en configuración de z-stack con una distancia entre planos de 2 μm . Las fotografías que se muestran son el resultado de la proyección máxima de estos stacks.

Los análisis de las imágenes se realizaron con el software ImageJ (NIH) sobre las proyecciones máximas de las imágenes. Las cuantificaciones de intensidad de fluorescencia se realizaron sobre las imágenes sin modificar. Para cuantificar las neuronas positivas para un determinado marcaje se utilizaron las imágenes obtenidas en el confocal. En las imágenes de fluorescencia del asta dorsal de la médula espinal, y con ayuda del atlas o del marcaje de interneuronas específicas de lámina, se delimitaron las láminas I y II. En las fotografías de secciones de DRG se consideró todo el ganglio. En cada región de interés se aplicó un umbral manualmente. Este umbral se fijó en el punto de intensidad en el que se eliminaba la señal del fondo. Se creó una máscara y se segmentó la imagen para seleccionar las partículas con intensidad superior al fondo y con un tamaño mayor de 10 μm^2 , asumiendo que estas partículas correspondían a células positivas. Después, se revisó célula por célula para comprobar que no se habían marcado como células estructuras que no lo eran.

3.11. Soluciones, reactivos y compuestos

3.11.1. Soluciones salinas

Solución extracelular neuronas DRG	
Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	140
KCl	3
CaCl ₂	2.4
MgCl ₂	1.3
Glucosa	10
HEPES	10

pH: 7.4

Osmolaridad: 290 mOsm/L

Solución intracelular de gluconato de potasio	
Compuesto	Concentración (mM)
C ₆ H ₁₁ KO ₇	135
NaCl	6
MgCl ₂	2
HEPES	10
EGTA	0.1
MgATP	2
NaGTP	0.3

pH: 7.3, ajustado con KOH

Osmolaridad: 300 mOsm/L

Tampón fosfato salino (PBS 0.1 M)	
Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	137
KCl	2.7
Na ₂ HPO ₄	10
KH ₂ PO ₄	2

pH: 7.4

Tampón fosfato (PB 0.1 M)	
Compuesto	Concentración (mM)
Na ₂ HPO ₄	84
NaH ₂ PO ₄	26

pH: 7.4

ACSF	
Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	118
NaHCO ₃	25
Glucosa	10
KCl	2.5
NaH ₂ PO ₄	1
CaCl ₂	2.5
MgCl ₂	1

pH: 7.4

Osmolaridad: 310 mOsm/L

ACSF sustituido con sacarosa	
Compuesto	Concentración (mM)
Sacarosa	250
NaHCO ₃	25
Glucosa	10
KCl	2.5
NaH ₂ PO ₄	1
CaCl ₂	2.5
MgCl ₂	1

pH: 7.4

Osmolaridad: 310 mOsm/L

Solución INCMix	
Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	155
K ₂ PO ₄	1.5
HEPES	10
Glucosa	5

pH: 7.4

Tampón trizma salino (TBS 1X)	
Compuesto	Concentración (mM)
Tris Base	20
NaCl	150

pH: 7.6

TABLA 3. Composición de las soluciones salinas utilizadas.

3.11.2. Compuestos usados en experimentos de imagen de calcio

Compuesto	[Stock] (mM)	Disolvente stock	[Final] (μ M)	Proveedor	Referencia	Observaciones
AITC	10	DMSO	100	Sigma	377430	Agonista del canal TRPA1
Capsaicina	0.1*	H ₂ Od	0.1	Sigma	2028	Agonista del canal TRPV1
WS-12	20	DMSO	0.5	Alomone	W-105	Agonista del canal TRPM8

TABLA 4. Preparación de los compuestos utilizados en los experimentos de imagen de calcio. *: se preparó un stock a 100 mM de capsaicina en etanol, y después se diluyó a 0.1 mM en agua destilada.

3.11.3. Anticuerpos utilizados

Diana	Proveedor	Referencia	Especie	Uso	Dilución
GFP/YFP	Abcam	ab13970	Pollo	Primario	1:2000
cFos	Abcam	ab190289	Conejo	Primario	1:2000
CGRP	Millipore	PC205L	Conejo	Primario	1:2000
PKCy	Santa Cruz	sc-211	Conejo	Primario	1:200
Tubulina β III	Biolegend	801201	Ratón	Primario	1:1000
GFAP	Cell Signalling	3670	Ratón	Primario	1:
Iba1				Primario	1:
IgG de pollo	Jackson IR	703-545-155	Burro	Secundario Alexa Fluor™ 488	1:1000
IgG de conejo	Invitrogen	A21206	Burro	Secundario Alexa Fluor™ 488	1:1000
IgG de conejo	Abcam	ab150062	Burro	Secundario Alexa Fluor™ 555	1:1000
IgG de conejo	Invitrogen	A11012	Cabra	Secundario Alexa Fluor™ 594	1:1000
IgG de conejo	Invitrogen	A31573	Burro	Secundario Alexa Fluor™ 647	1:1000
IgG de ratón	Invitrogen	A21237	Cabra	Secundario Alexa Fluor™ 647	1:1000
IB4*	Invitrogen	I21413	-	Primario Alexa Fluor™ 594	1:400

TABLA 5. Anticuerpos utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica.

*La isolectina IB4 es una glucoproteína que se une a glucoconjugados presentes en la membrana de nociceptores no peptidérgicos (Bogen et al. 2015). No es propiamente un anticuerpo, pero se añade junto con los anticuerpos primarios. No necesita anticuerpo secundario al estar fusionado con una molécula fluorescente.

3.12. Representación de los datos y estadística

Para la representación de los datos, se utilizaron los programas GraphPad Prism 8 (GraphPad) y Origin 8 (OriginLab). El montaje de los paneles y figuras se realizó con el programa de código abierto Inkscape (Proyecto de Inkscape). El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 8. Los test estadísticos aplicados, así como la significancia en cada caso se detallan en los pies de figura correspondientes. Para la comparación de medias se usó el test de la *t* de Student cuando las distribuciones eran normales, y el test de Mann-Whitney cuando no lo eran. Para la comparación entre 3 o más grupos se usó el análisis de la varianza ANOVA de dos vías seguido de un test post-hoc de Sidak o Tukey para comparaciones múltiples. En caso de que se comparara la media de un grupo experimental con la media de un grupo control se usó un test post-hoc de Sidak. Para la comparación de las medias de varios grupos entre sí, se utilizó un test post-hoc de Tukey. Para la comparación de proporciones se usó el test exacto de Fisher.







4. RESULTADOS



BLOQUE I: CARACTERIZACIÓN DE LAS NEURONAS SENSORIALES QUE EXPRESAN TRPA1, SU ACTIVACIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE OPTOGENÉTICA Y LA IDENTIFICACIÓN DE SUS DIANAS EN LA MÉDULA ESPINAL

En este primer bloque de experimentos, se describirá una caracterización de la población de neuronas sensoriales que expresan el canal iónico TRPA1 (TRPA1⁺), identificando algunos de sus tejidos diana y utilizando herramientas de optogenética que permiten su activación selectiva.

4.1. Identificación de terminales TRPA1⁺ que inervan la superficie plantar

En primer lugar, se estudió la presencia de terminaciones nerviosas de neuronas TRPA1⁺ en la superficie plantar de la extremidad posterior del ratón. La confirmación de la presencia de estos terminales permitiría después estimular selectivamente con luz pulsátil esas fibras en el ratón TRPA1-ChR2-EYFP.

4.1.1. Trazado de la inervación cutánea de la superficie plantar

Para marcar de manera selectiva las neuronas sensoriales que inervan la superficie plantar se administró por vía intraplantar la lectina WGA unida a la molécula fluorescente Alexa Fluor™ 594 (Fig. 18.A). La WGA es captada mediante difusión y mecanismos de endocitosis por las terminales nerviosas próximas al sitio de inyección, se transporta en vesículas y se distribuye por todas las regiones celulares (Levy, White, y Sillitoe 2015), incluidos los somas de las neuronas. Para comprobar el correcto marcaje de las neuronas que inervan la región plantar, se extrajeron los DRG lumbares L3-L4-L5 correspondientes al lado inyectado, que son los ganglios donde se localizan las neuronas que contribuyen a la inervación cutánea plantar de la extremidad posterior (Rigaud et al. 2008; da Silva Serra et al. 2016). La inmunohistoquímica mostró que, en

esos ganglios, un 20.8 % de las neuronas sensoriales presentaban fluorescencia roja, indicando que eran aferentes cutáneos plantares (Fig. 18.B), mientras que en los ganglios cervicales y torácicos las neuronas marcadas representaban un porcentaje marginal del total (1.2 %, Fig. 18.C).

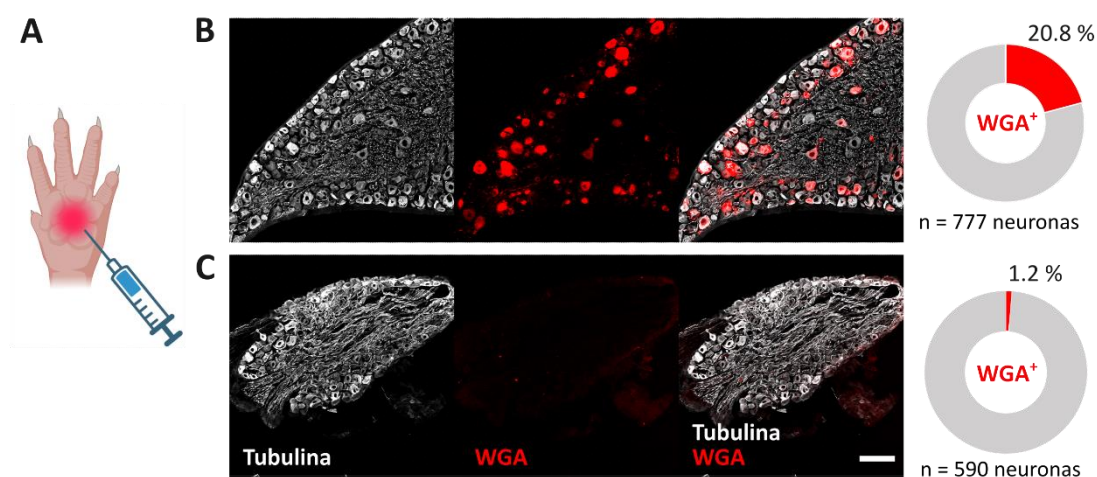


FIGURA 18. Marcaje de neuronas sensoriales aferentes de la región plantar. (A): Representación de la inyección intraplantar de WGA. (B, C, izquierda): Imagen confocal representativa de la inmunohistoquímica de un ganglio raquídeo lumbar (B) y uno torácico (C) ipsilaterales a la inyección. Blanco: tubulina β III. Rojo: WGA 594. Barra de escala: 100 μ m. (B, C, derecha): diagrama que presenta el porcentaje de neuronas marcadas con WGA respecto al total de las células tubulina positivas en los ganglios lumbares (B) y torácicos (C). n = 2 ratones, 4 cortes por grupo de DRG.

4.1.2. Caracterización funcional del canal TRPA1 en neuronas sensoriales aferentes plantares y comparación con aferentes viscerales

La falta de anticuerpos fiables dificulta la detección de TRPA1 en cortes histológicos. Por ello, para estudiar su expresión se planteó como alternativa la caracterización funcional de este canal en las neuronas que inervan la superficie plantar. Tras la inyección de WGA, los ganglios lumbares se extrajeron y se disociaron, y las neuronas sensoriales se sembraron para realizar los experimentos de imagen de calcio. El 16.1 % de las neuronas presentaban fluorescencia roja (Fig. 19.A), un porcentaje similar al observado en las rodajas de tejido (Fig. 18.B). El experimento de imagen de calcio mostró que un 50 % de las neuronas marcadas con WGA respondían a AITC, un agonista específico del canal TRPA1 (Fig. 19.B, C). En el grupo de las neuronas no marcadas,

es decir, entre las neuronas que inervan regiones diferentes a la superficie plantar, el porcentaje que respondió a AITC fue significativamente menor, un 38.2 % ($p = 0.043$, test exacto de Fisher). *Esto indica que la mitad de las neuronas aferentes cutáneas plantares expresan el canal TRPA1.* Además, la aplicación de agonistas específicos para otros canales iónicos, como son el WS12 y la capsaicina, mostró que un 2.3 % y un 27.3 % de las neuronas WGA⁺ expresan TRPM8 y TRPV1 respectivamente (Fig. 19.C). No se observaron diferencias en la amplitud de la respuesta de calcio a los diferentes agonistas entre las neuronas WGA⁺ y las WGA⁻ (Fig. 19.D).

La distribución de los terminales TRPA1⁺ no se restringe a nervios somáticos de la superficie cutánea (Nassenstein et al. 2008; Kondo et al. 2009). Para comprobar su presencia en nervios viscerales, se reprodujo el experimento inyectando en la pared del estómago, un órgano inervado por neuronas que conforman el componente visceral del nervio vago y que tienen sus somas en los ganglios vagales (VG) (Akerman y Romero-Reyes 2020; Wang et al. 2020). Por falta de disponibilidad de WGA, se utilizó Dil al 0.5 % o 1 % como trazador. El Dil es un colorante de la familia de las carbocianinas que, por su naturaleza lipofílica, se inserta en la membrana plasmática y difunde libremente a lo largo del axón, lo que permite el trazado anterógrado de terminales aferentes (Honig y Hume 1986; Godement et al. 1987). Unos días después de la inyección, se extrajeron los VG de los animales inyectados y se disgregaron y sembraron sus neuronas. Se observó que solo un 2.6 % de ellas presentaban fluorescencia roja, y por lo tanto, se consideraron aferentes del estómago (Fig. 19.E). Los experimentos funcionales mostraron que, en este caso, un 22.2 % de las neuronas rojas respondían a AITC y por lo tanto expresaban TRPA1. Sin embargo, más de la mitad, un 55.6 %, respondían a capsaicina, el agonista de TRPV1, siendo este porcentaje mayor que en las neuronas vagales que inervan otras regiones (Fig. 19.F, G). No se apreciaron diferencias significativas en la amplitud de las respuestas de calcio a los diferentes agonistas (Fig. 19.H).

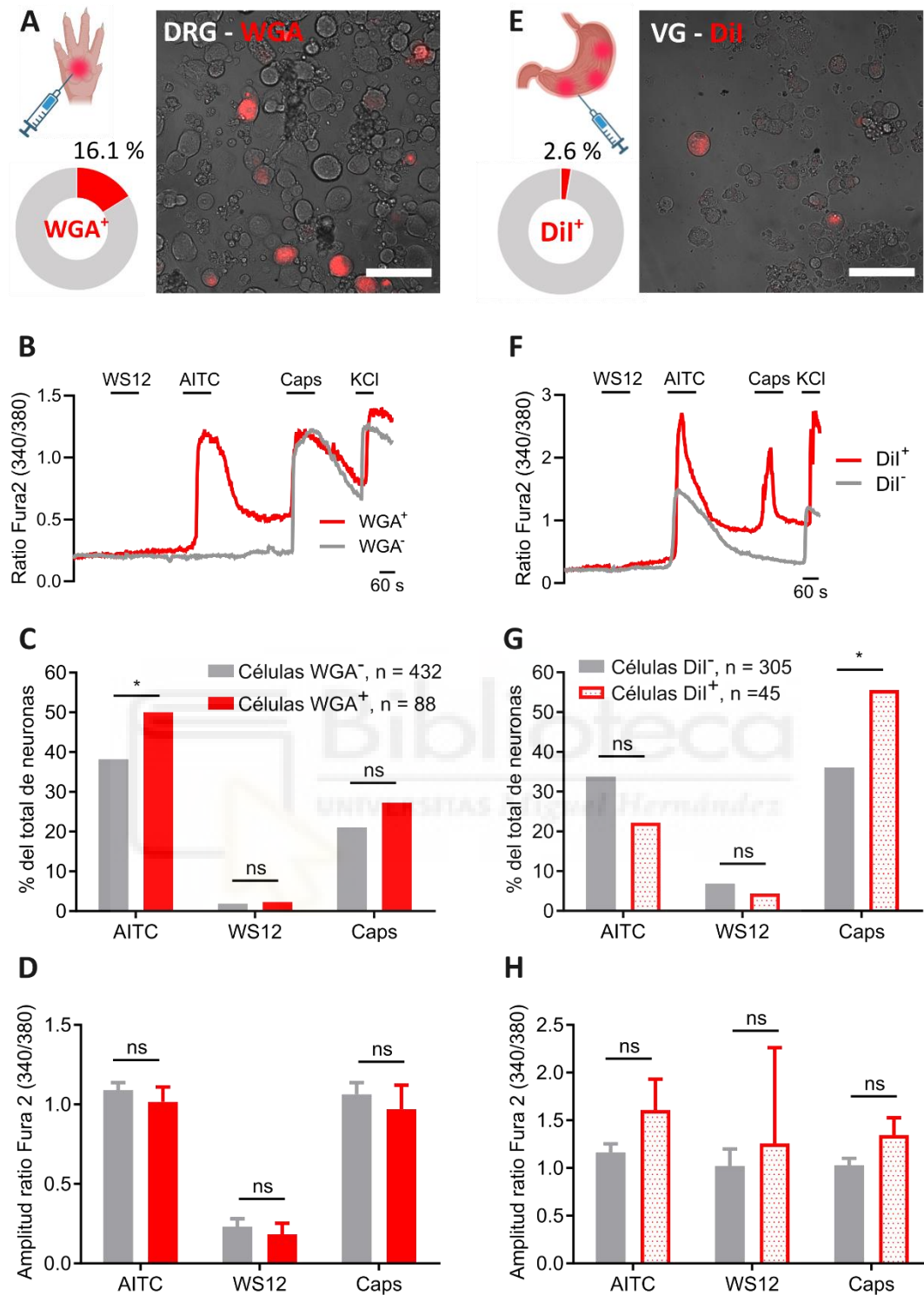


FIGURA 19. Respuestas a los agonistas de TRPA1, TRPM8 y TRPV1 de las neuronas que inervan la superficie plantar (A-D) y la pared estomacal (E-H). (A, E): Imágenes del cultivo de neuronas de los DRG lumbares tras la inyección intraplantar del trazador WGA (A) y de neuronas de los VG tras la inyección en la pared del estómago del trazador Dil (E), junto con la proporción de células marcadas en cada caso, WGA⁺ o Dil⁺. n = 2 ratones por cada grupo. Barras de escala: 100 μ m. (B, F): Trazos representativos de la concentración de calcio intracelular medido como razón

de la fluorescencia de Fura2 (340/380) en neuronas disociadas de DRG (B) y de VG (F) al aplicar diferentes agonistas de canales TRP. El trazo rojo representa una neurona marcada con el trazador (WGA o Dil) y el trazo gris, una no marcada. (C, G): Porcentaje de neuronas que responden a los diferentes agonistas: AITC (100 μ M) para TRPA1, WS12 (0.1 μ M) para TRPM8 y capsaicina (0.5 μ M, Caps) para TRPV1, en los cultivos de DRG (C) o VG (G) (* = $p < 0.05$, test exacto de Fisher). (D, H): Amplitud de las respuestas de calcio a los diferentes agonistas de canales iónicos en los cultivos de DRG (D) o VG (H), representada como la razón de Fura2 (340/380) u.a. (ns = diferencias no significativas, test de Mann Whitney). La n en el gráfico indica el número de neuronas, procedentes de al menos 3 ratones en cada caso.

4.2. Estimulación selectiva de fibras TRPA1⁺ mediante técnicas de optogenética

Una vez demostrado que las fibras TRPA1⁺ inervan la superficie plantar, se utilizó la línea de ratón transgénico TRPA1-ChR2-EYFP, que expresa el canal activado por luz canalrodopsina-2 fusionado a una molécula fluorescente EYFP en las células TRPA1⁺. Este modelo nos permitió activar selectivamente esta subpoblación neuronal con luz y caracterizar sus respuestas.

4.2.1. Caracterización funcional de la línea de ratón transgénico TRPA1-ChR2-EYFP mediante imagen de calcio

En primer lugar, se llevaron a cabo experimentos de imagen de calcio en neuronas disociadas de los DRG de dicha línea transgénica con dos objetivos. El primero, comprobar que la recombinación, y por tanto la expresión de la ChR2-EYFP, se producía únicamente en las neuronas TRPA1⁺. Y el segundo, determinar si la aplicación de luz pulsante sobre estas neuronas era suficiente para evocar un incremento del calcio intracelular consecuencia de la apertura de los canales ChR2 sensibles a luz que se expresan en las neuronas TRPA1⁺.

Para comprobar que la expresión de ChR2-EYFP se restringía a las neuronas TRPA1⁺, se aplicó AITC, el agonista de TRPA1, a las neuronas disociadas en cultivo. Entre las células ChR2-EYFP⁺, reconocibles por la fluorescencia verde, un 95,9 % (47 de 49 neuronas) respondieron a AITC (Fig. 20.B, C). Entre las neuronas no fluorescentes también existía una proporción relativamente alta de neuronas que respondían a AITC, un 42.7 % (160 de 375 neuronas) (Fig. 20.B, C). *Esto nos indica que la expresión de la proteína de fusión ChR2-EYFP está restringida casi exclusivamente*

a células que expresaban el canal TRPA1. No obstante, la eficiencia de la recombinación no era lo suficientemente alta como para que toda la población TRPA1⁺ expresara el constructo, dando lugar a una subpoblación de neuronas TRPA1⁺ sin marcaje fluorescente. Más específicamente, nuestro modelo conseguía marcar un 22.7 % (47 de 207 neuronas) de toda la población que respondía a AITC (Fig. 20.C). Esto no supone un problema, porque el modelo asegura que la estimulación con luz, aunque no active toda la población de neuronas sensoriales TRPA1⁺, sí que activa de manera específica una fracción significativa de ésta.

Para comprobar si la aplicación de pulsos de luz sobre las neuronas disociadas es suficiente para despolarizarla e inducir la entrada de calcio en la célula, se aplicaron pulsos de luz a diferentes frecuencias, 5, 10 y 20 Hz, durante 2 segundos y se realizó imagen de calcio. Como se observa en los trazos de fluorescencia de la Fig. 20.D, ninguna de las frecuencias de luz aplicadas fue suficiente para producir un aumento de calcio intracelular detectable mediante el sistema fluorométrico en las células ChR2-EYFP⁺. Es posible que esto se deba a una limitación metodológica, ya que es incompatible la adquisición de imagen a la longitud de onda de emisión del Fura-2AM al mismo tiempo que se aplica la luz azul necesaria para inducir la apertura del canal. Por tanto, existe un desfase entre la aplicación de luz y la adquisición de la imagen, lo que hace perder la resolución temporal requerida para detectar estos cambios.

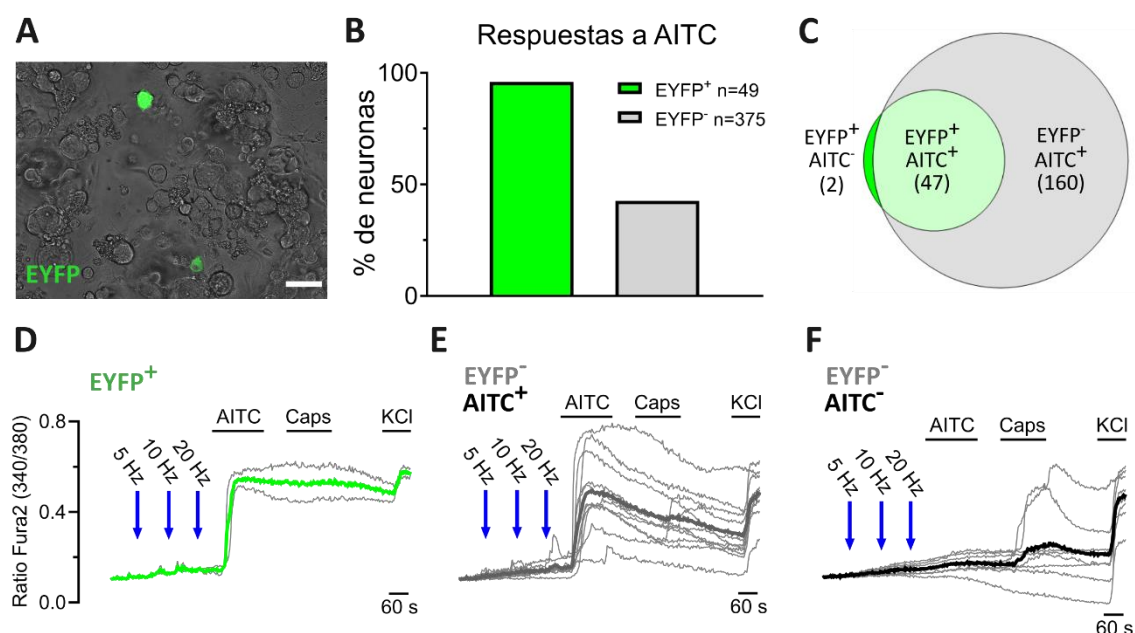


FIGURA 20. Caracterización mediante imagen de calcio de las neuronas TRPA1⁺/ChR2-EYFP⁺. (A): Imagen representativa de neuronas de DRG en cultivo del ratón TRPA1-ChR2-EYFP, composición de la imagen en luz transmitida y de la fluorescencia en verde. Barra de escala: 50 μ m. (B, C): Diagramas que muestran la proporción de neuronas EYFP⁺ y EYFP⁻ que responden a AITC (100 μ M). Entre paréntesis se muestra el número de células en cada grupo. (D, E, F): Trazos representativos de la señal de calcio intracelular para neuronas EYFP⁺ (D), EYFP⁻ que respondían a AITC (E) y EYFP⁻ que no respondían a AITC (F). Los trazos finos representan neuronas individuales, los trazos gruesos coloreados representan la media de los trazos individuales correspondientes. n = 3 ratones.

4.2.2. Registro de corrientes de acción generadas por estimulación con luz en neuronas TRPA1⁺/ChR2-EYFP⁺.

Los experimentos de imagen de calcio no poseían la suficiente resolución temporal para detectar entradas de calcio inducidas por la apertura de los canales ChR2 tras exponerlos a la luz azul pulsante. Por ello, se llevaron a cabo experimentos de *patch-clamp* en configuración de *cell attached*, lo que nos permitió obtener registros extracelulares de las corrientes de acción de las neuronas sensoriales al estimularlas con pulsos de luz. Al igual que con los experimentos de imagen de calcio, estos registros se llevaron a cabo en neuronas disociadas procedentes de los DRG de ratones TRPA1-ChR2-EYFP (Fig. 21.A).

En fijación de voltaje a 0 mV, se aplicaron pulsos de luz de 10 ms. La duración del tren de pulsos fue de 2 s a una frecuencia de 10 Hz, por lo que se dieron 20 pulsos en cada secuencia.

Para la primera secuencia, se estableció la irradiancia a un 20 % de la intensidad máxima, y se comprobó la proporción relativa (considerando el 100 % al número de respuestas evocadas por la intensidad máxima) de pulsos de luz que evocaban una corriente de acción. Tras un minuto de espera, se aplicó un segundo tren aumentando la irradiancia a un 40 %, y así sucesivamente (Fig. 21.B). Como se muestra en la Figura 21.D, a medida que aumenta la intensidad de la luz, aumenta el número de pulsos de luz que evocan corrientes de acción, aunque a la máxima intensidad ya no se observa un aumento de la frecuencia de disparo. *Por tanto, la actividad de los canales canalrodopsina es dependiente de la intensidad de la luz aplicada a la frecuencia de estimulación aplicada (10 Hz).* Las corrientes observadas presentaban una amplitud y forma similares (Fig. 21.C).



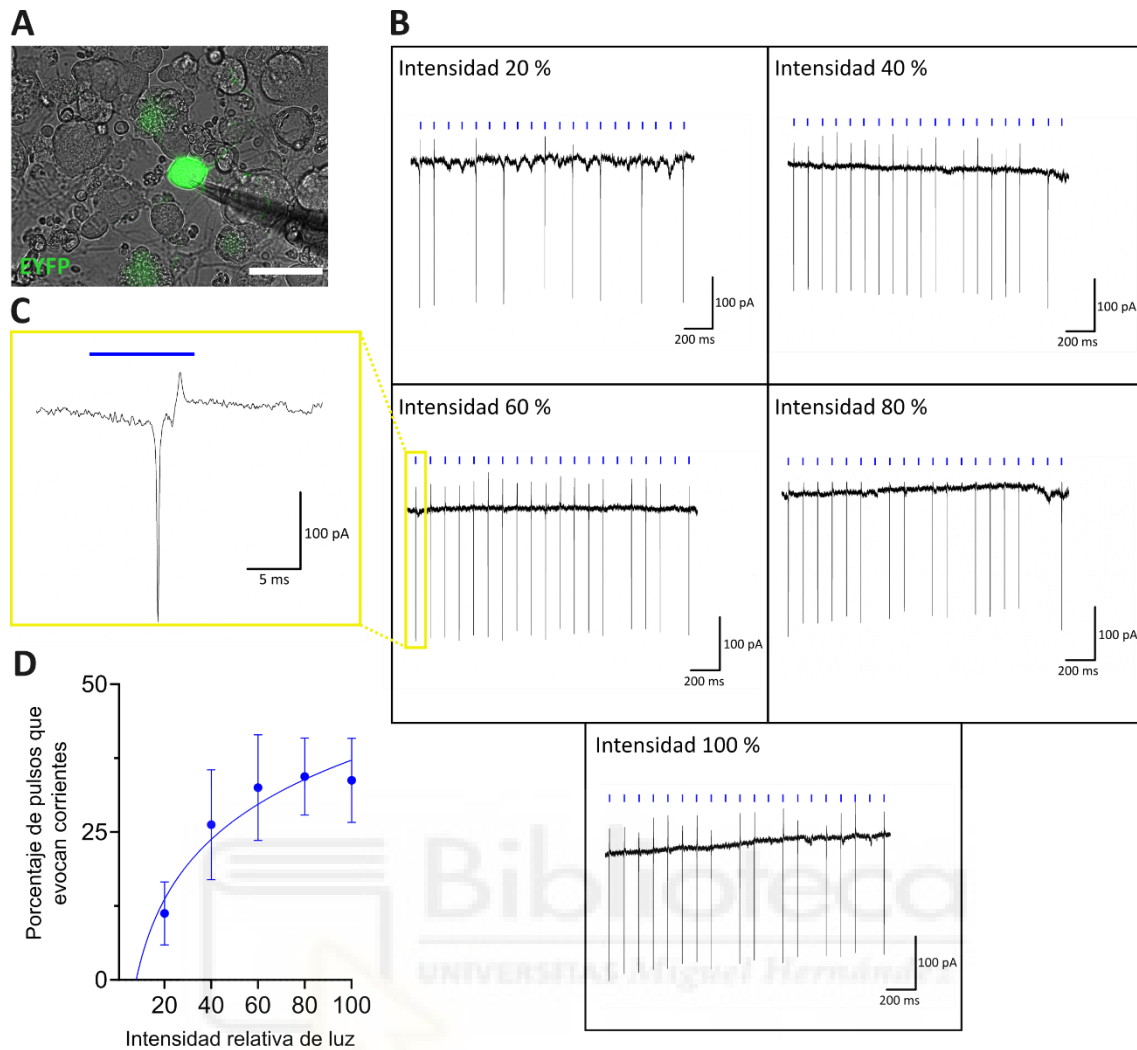


FIGURA 21. Activación de las corrientes de acción evocadas por pulsos de luz en neuronas sensoriales disociadas de DRG de la línea de ratón TRPA1-ChR2-EYFP. (A): Configuración de célula adherida en una neurona EYFP⁺. Barra de escala: 50 μ m. (B): Trazos representativos de las corrientes de acción evocadas por la estimulación con trenes de 20 pulsos de luz azul (488 nm) a diferentes intensidades en una misma neurona. (C): Corriente de acción expandida, con las fases negativa y positiva características; el trazo superior azul indica la duración del estímulo. (D): Porcentaje de pulsos que son capaces de evocar una corriente de acción para cada intensidad de luz aplicada. El número de pulsos que evocan corrientes correlaciona con la intensidad de la luz (coeficiente de Pearson $r = 0.86$). La línea representa el ajuste a una regresión no lineal (logarítmica). El círculo representa la media, las barras, el error estándar de la media (SEM) para 8 células procedentes de 3 ratones.

4.2.3. Estudio de las respuestas conductuales provocadas por la estimulación por luz de las terminaciones TRPA1⁺ en la superficie plantar del ratón TRPA1-ChR2-EYFP

Tras confirmar que la aplicación de pulsos de luz azul era suficiente para activar corrientes de acción en neuronas TRPA1⁺/ChR2-EYFP⁺ en cultivo, caracterizamos el comportamiento evocado por la activación de estas neuronas en la superficie plantar de los ratones sin restricciones de movimiento (Fig. 22.A). Para ello, durante un intervalo de 20 segundos se aplicó luz de diferentes frecuencias e intensidades en la superficie plantar de la pata trasera y se analizaron los comportamientos de retirada, retracción y lamida. Se comprobó que, para las diferentes frecuencias e intensidades de luz, el comportamiento de retracción se daba en un porcentaje variable de los ensayos (Fig. 22.B), considerando cada ensayo como un intervalo de estimulación de 20 segundos. En cada ensayo, la media del número de retiradas que realizaba el animal variaba normalmente entre 1 y 2 para las diferentes frecuencias e intensidades (Fig. 22.C). Para el comportamiento de retracción, sin embargo, el factor intensidad sí que influía significativamente ($p < 0.005$, ANOVA de dos vías), aumentando la probabilidad de que ocurra este comportamiento a medida que aumenta la intensidad de la luz (Fig. 22.D). También el tiempo dedicado a este comportamiento aumentaba significativamente a medida que aumenta la intensidad ($p < 0.005$, ANOVA de dos vías) (Fig. 22.E). En el caso del comportamiento de lamida de la pata, la intensidad también influía significativamente tanto en el porcentaje de ensayos en los que se daba este comportamiento como en el tiempo dedicado a él en cada ensayo ($p < 0.0005$ para ambos, ANOVA de dos vías) (Fig. 22.F, G). Mientras que a la intensidad mínima (2 % del máximo) el comportamiento de lamida apareció en un 33.3 y 41.7 % de los ensayos para frecuencias de 5 y 10 Hz respectivamente, a partir de un 33 % de la intensidad máxima el comportamiento se dio prácticamente en todos los ensayos. Además, a partir de esa intensidad, el tiempo dedicado a la lamida de la pata constituía prácticamente la mitad del tiempo de estimulación. *La intensidad de la luz, por lo tanto, se reveló como el factor que explica la mayor parte de la varianza en los comportamientos nocifensivos estudiados, mientras que la frecuencia de la luz no influye significativamente sobre ellos.*

Como control, se utilizaron ratones procedentes de la misma línea de ratones, pero que no incluían el transgén ChR2-EYFP (ChR2-EYFP⁻ en la Figura 22). Estos animales se estimularon siguiendo el mismo protocolo, empleando las dos frecuencias y sólo las tres intensidades más altas. No se observó comportamiento nocifensivo en ellos, en ninguno de los ensayos (Fig. 22.B, D, F), descartando un posible efecto térmico de la luz sobre la pata de los ratones.

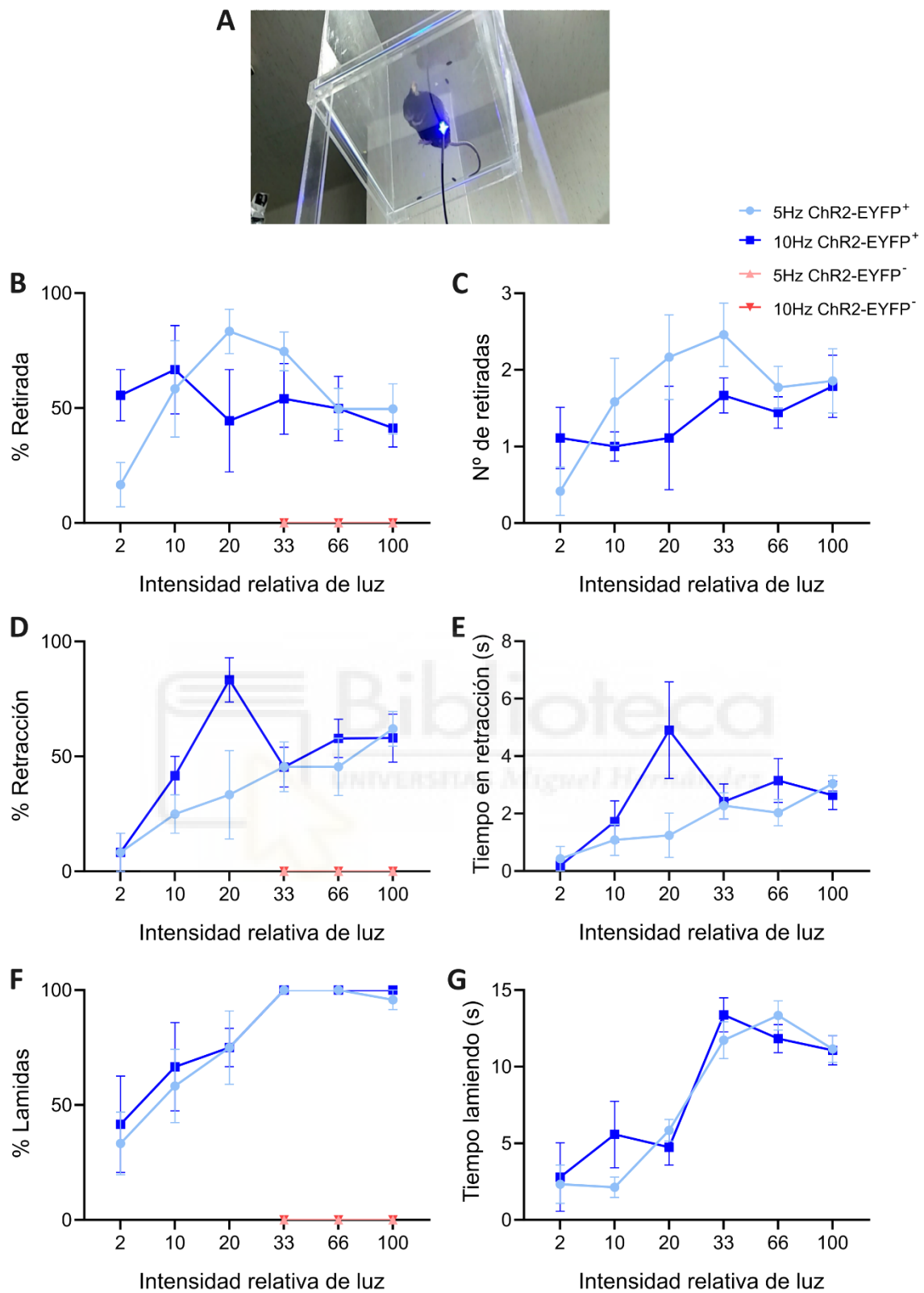


FIGURA 22. Comportamientos nocifensivos evocados por la estimulación con luz en el ratón TRPA1-ChR2-EYFP. (A): Imagen que muestra la disposición de la plataforma de vidrio y la aplicación de la luz en la superficie plantar mediante la fibra óptica. (B): Porcentaje de ensayos

en los que se produjo el comportamiento de retirada para cada intensidad y frecuencia de luz. (C): Número de retiradas que se producían por cada ensayo. (D): Porcentaje de ensayos en los que se produjo el comportamiento de retracción. (E): Tiempo dedicado a la retracción por cada ensayo. (F): Porcentaje de ensayos en los que se produjo el comportamiento de lamida. (G): Tiempo dedicado a la lamida por cada ensayo. Los círculos representan la media y las barras la SEM, para al menos 3 ratones para cada intensidad y frecuencia.

4.3. Caracterización molecular y conectividad en la médula espinal de las neuronas sensoriales TRPA1⁺

Tras caracterizar funcionalmente las neuronas TRPA1⁺ y estudiar los comportamientos nocifensivos desencadenados por su activación selectiva, nos centramos en describir la naturaleza molecular de esta subpoblación y sus proyecciones hacia la médula espinal.

4.3.1. Clasificación de las neuronas TRPA1⁺/ChR2-EYFP⁺ como nociceptores peptidérgicos o no peptidérgicos

Según la literatura, los nociceptores se dividen clásicamente en peptidérgicos, aquellos que expresan los péptidos CGRP o SP, y los no peptidérgicos, reconocidos porque pueden unir la lectina IB4 (Snider y McMahon 1998; Dirajlal et al. 2003). Para identificar a cuál de estas dos poblaciones de nociceptores pertenecen las neuronas TRPA1⁺ marcadas en la línea de ratón transgénico usada, se extrajeron los DRG y se llevó a cabo la inmunohistoquímica sobre secciones de tejido.

Para comprobar qué porcentaje de neuronas TRPA1⁺ pertenecen al grupo de las peptidérgicas se utilizó el anticuerpo anti-CGRP, junto con el anticuerpo anti-GFP para reconocer las células que expresaba el constructo ChR2-EYFP (Fig. 23.A). En este bloque de experimentos, un 7.5 % de todas las neuronas de los DRG analizados expresaban EYFP (196 de 2602 neuronas), esto es, expresaban TRPA1, mientras que un 36.6 % expresaban CGRP (952 de 2602 neuronas, Fig. 23.B). Sin embargo, sólo un 17.9 % de todas las neuronas EYFP⁺ (35 de 196 neuronas) expresaban también CGRP. Entre las CGRP⁺, solo un pequeño porcentaje expresaba también EYFP (el 3.7 %, 35 de 952 neuronas, Fig. 23.C). Por lo tanto, podemos decir que la población de neuronas TRPA1⁺ que se marcan en la línea de ratón TRPA1-ChR2-EYFP constituyen una

población que mayoritariamente no expresa el marcador peptidérgico CGRP. La pequeña fracción de neuronas EYFP⁺/CGRP⁺, además, muestra un tamaño ligeramente inferior al resto de neuronas EYFP⁻/CGRP⁺. Esta diferencia no llega a ser significativa, probablemente debido al bajo número de células EYFP⁺/CGRP⁺ (Fig. 23.D).

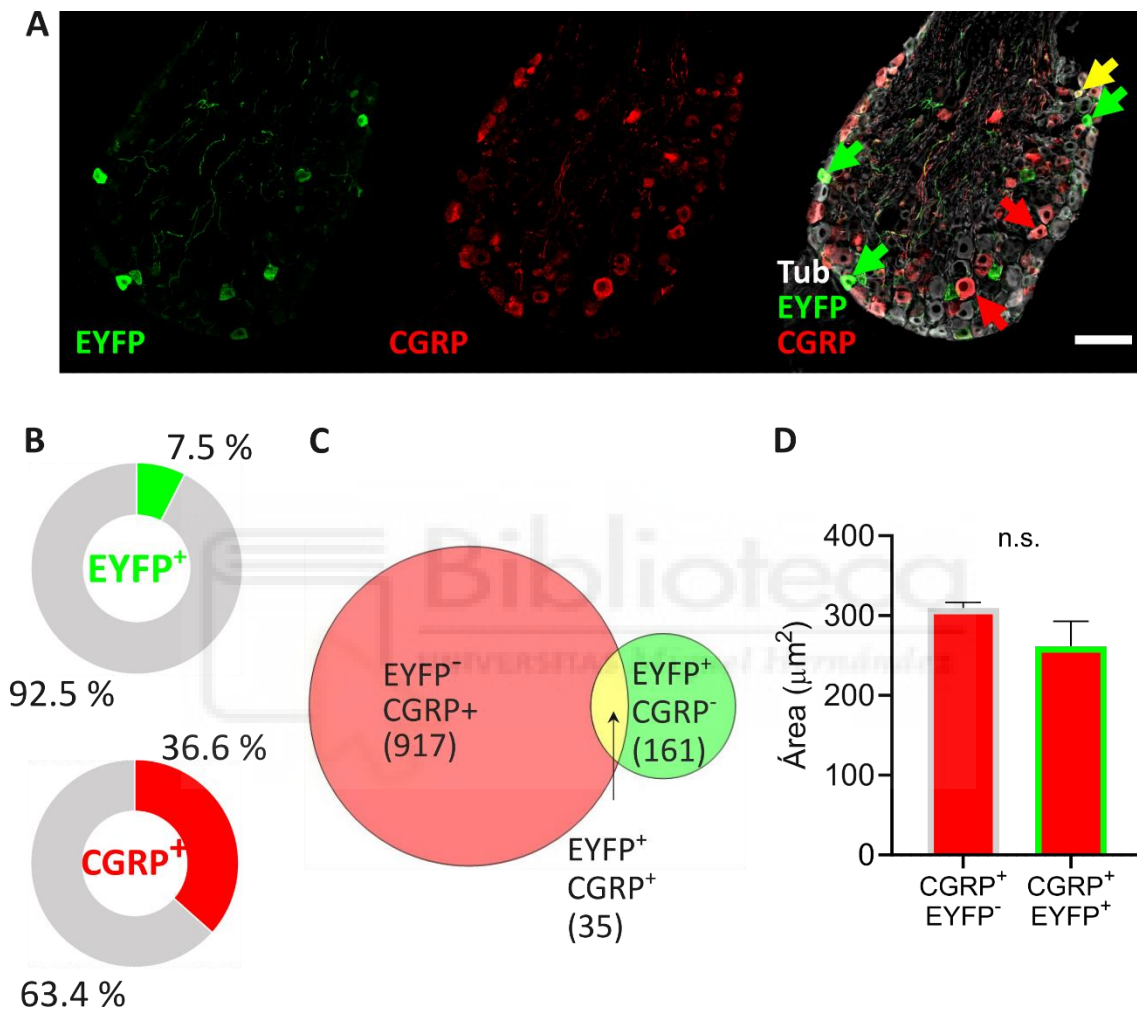


FIGURA 23. Co-localización de la expresión de EYFP con el marcador peptidérgico CGRP en DRG del ratón TRPA1-ChR2-EYFP. (A) Imagen confocal representativa de la inmunohistoquímica en sección de DRG. Verde: EYFP. Rojo: CGRP. Blanco: tubulina βIII. Las flechas verdes, rojas y amarillas marcan neuronas EYFP⁺/CGRP⁻, EYFP⁻/CGRP⁺ y EYFP⁺/CGRP⁺ respectivamente. Barra de escala: 100 μm. (B): Diagramas que muestran la proporción de neuronas EYFP⁺ y CGRP⁺ respecto del total de neuronas de DRG cuantificadas. (C): Diagrama de Venn que muestra la co-localización del marcaje de EYFP y CGRP. Entre paréntesis se muestra el número de células de cada grupo. (D): Comparación entre la superficie celular de las neuronas EYFP⁺/CGRP⁺ y las EYFP⁻/CGRP⁺, representadas como la media y su SEM. n = 2602 células procedentes de 5 ratones (n.s. = diferencias no significativas).

El análisis de la co-localización de EYFP con CGRP revela que, según nuestro modelo, el canal TRPA1 se expresa sólo en una pequeña proporción de nociceptores peptidérgicos. Es posible, por tanto, que la mayor parte de TRPA1 se exprese en la otra gran familia de nociceptores, los no peptidérgicos. Para identificar a estos últimos en cortes de DRG, se añadió la lectina IB4 unida a una molécula fluorescente Alexa Fluor™ 594 durante el protocolo de inmunohistoquímica en lugar del anticuerpo anti-CGRP (Fig. 24.A). En este grupo de ratones, el porcentaje de neuronas EYFP⁺ es muy similar al anterior, de un 8.6 % (185 de 2148 neuronas), y el 37.5 % de todas las neuronas de DRG cuantificadas se marcaron con IB4 (806 de 2148 neuronas, Fig. 24.B). La mayoría (el 84.9 %, 157 de 185 neuronas) de las células EYFP⁺ se marcaban también con IB4. Entre las IB4⁺, un 19,5 % (157 de 806 neuronas) expresaban también EYFP. (Fig. 24.C). Además, dentro de la población de neuronas IB4⁺, las EYFP⁺ presentaban un tamaño significativamente menor a las EYFP⁻ (Fig. 24.D). *En conjunto, estos datos nos permiten afirmar que la población de neuronas TRPA1⁺ marcadas en la línea de ratón TRPA1-ChR2-EYFP está compuesta mayoritariamente por nociceptores no peptidérgicos con somas de pequeño tamaño.*



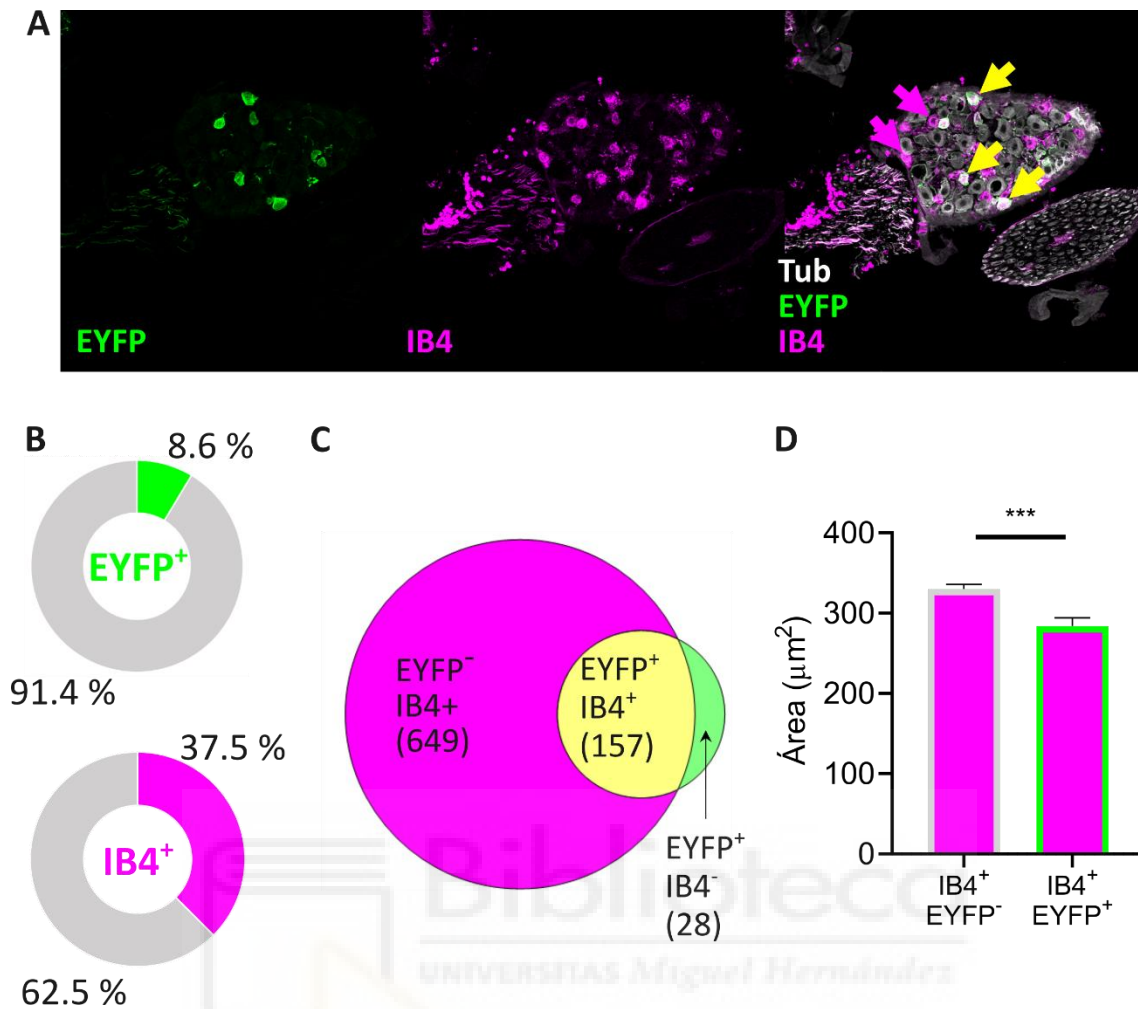


FIGURA 24. Co-localización de la expresión de EYFP con el marcador no peptidérgico IB4 en DRG del ratón TRPA1-ChR2-EYFP. (A) Imagen de microscopía confocal representativa de la inmunohistoquímica en sección de ganglio de la raíz dorsal. Verde: EYFP. Magenta: IB4. Blanco: tubulina β III. Las flechas magenta y amarillas marcan neuronas EYFP⁻/IB4⁺ y EYFP⁺/IB4⁺ respectivamente. Barra de escala: 100 μ m. (B): Diagramas que muestran la proporción de neuronas EYFP⁺ y IB4⁺ respecto del total de neuronas de DRG cuantificadas. (C): Diagrama de Venn que muestra la co-localización del marcaje de EYFP e IB4. Entre paréntesis se muestra el número de células de cada grupo. (D): Comparación entre la superficie celular de las neuronas EYFP⁺/IB4⁺ y las EYFP⁻/IB4⁺, representadas como la media y su SEM (*** = $p < 0.001$, test de Mann-Whitney). $n = 2148$ células procedentes de 3 ratones.

4.3.2. Proyecciones de las neuronas TRPA1⁺, su entrada en médula y conexiones con neuronas espinales

Una vez identificados los órganos diana de las terminaciones periféricas de estas neuronas, como es la piel de la superficie plantar, y su clasificación mayoritaria como nociceptores no peptidérgicos, nos centramos en estudiar la localización de las ramas centrales de las neuronas

sensoriales TRPA1⁺ tras su entrada en la porción dorsal de la médula espinal, y las láminas donde estas prolongaciones terminan. Para ello, se perfundieron ratones TRPA1-ChR2-EYFP para la extracción y procesamiento de la porción lumbar de la médula espinal, y se llevaron a cabo tinciones histoquímicas para identificar las fibras EYFP⁺. En primer lugar, se observó que en el corte lumbar de médula espinal la fluorescencia EYFP aparece únicamente como fibras aferentes en las astas dorsales (Fig. 25.A). Salvo algún soma aislado en láminas profundas, no apareció marcaje verde en fibras ni en somas de ninguna otra región de la médula espinal.

Para identificar de manera más precisa las láminas que reciben las fibras aferentes TRPA1⁺, utilizamos como referencia el marcador PKC γ , que marca una población de interneuronas excitatorias localizadas en la porción ventral de la lámina II interna (I_{liv}) (Malmberg et al. 1997; Neumann et al. 2008). Se observó que las proyecciones centrales de algunas fibras EYFP⁺, tras penetrar en ambas astas dorsales, alcanzan esta lámina I_{li}, aunque mayoritariamente terminan formando una banda inmediatamente dorsal a la capa de interneuronas PKC γ ⁺ (Fig. 25.A). *Por tanto, podemos afirmar que las neuronas sensoriales TRPA1⁺ tienen como diana central neuronas que se encuentran localizadas en la lámina II, especialmente en su porción dorsal o externa (I_{lo} y I_{li} dorsal), y que deben establecer conexiones con neuronas de esa capa, o cuyas dendritas terminen en dicha capa.*

La herramienta molecular empleada para identificar las neuronas diana de las terminales TRPA1⁺ en la médula espinal fue el marcaje de la proteína cFos. Esta proteína se expresa en neuronas postsinápticas de la médula espinal tras la estimulación de neuronas sensoriales primarias (Hunt et al. 1987). En nuestro modelo, esta estimulación no fue otra que la aplicación transdérmica de pulsos de luz en una de las extremidades, que como se demostró previamente, activan selectivamente las neuronas sensoriales TRPA1⁺. Tras esperar 2 horas para que se indujeran los cambios de expresión génica y la síntesis de la proteína, los ratones se sacrificaron y se extrajeron las médulas espinales, que se procesaron y cortaron para la cuantificación. En las secciones de tejido, la inmunohistoquímica mostró un marcaje de cFos más abundante en el lado ipsilateral (el correspondiente a la pata estimulada), y especialmente concentrado en las láminas más superficiales (Fig. 25.B). Mientras que en la lámina I la diferencia entre la media de células cFos⁺ por corte entre el lado ipsilateral y el contralateral no llega a ser significativa (4.9 ± 0.6 vs 2.0 ± 0.3 células), esta diferencia sí que es significativa para la lámina II ($p < 0.0001$, 28.9 ± 2.0 vs 11.2 ± 1.3 células, Fig. 25.C). Este marcaje se encontró tanto en la porción interna como en la externa de la lámina II, tanto en el lado ipsi como en el contralateral.

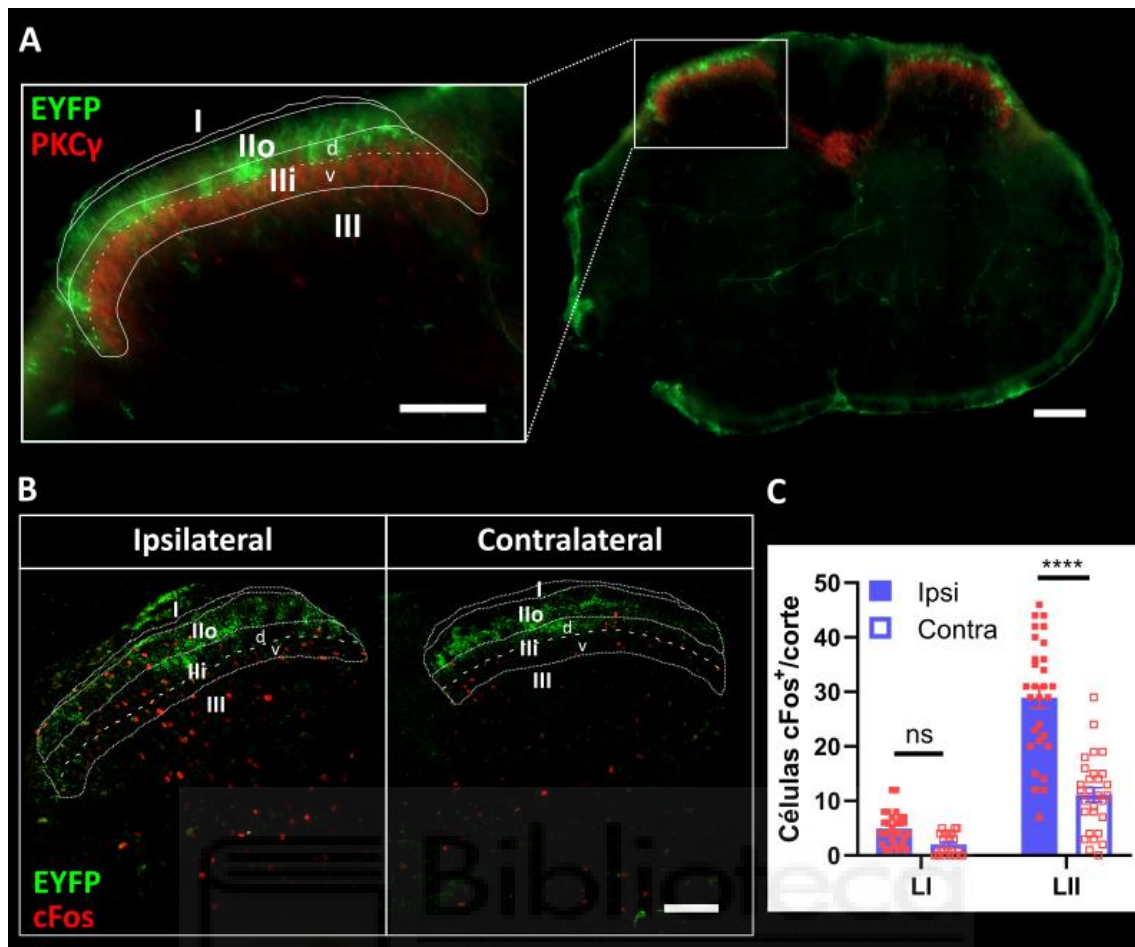


FIGURA 25. Entrada de las fibras TRPA1⁺ en la médula espinal y neuronas activadas por su estimulación con luz en el ratón TRPA1-ChR2-EYFP. (A, derecha): Imagen de microscopía en mosaico de la inmunohistoquímica en un corte coronal de la porción lumbar de la médula espinal de un ratón TRPA1-ChR2-EYFP. Verde: EYFP. Rojo: PKCγ. Barra de escala: 100 μm. (A, izquierda): Magnificación de un asta dorsal delimitando las láminas I, II externa (IIo), II interna (IIi, con sus porciones dorsales (d) y ventrales (v) y la capa de células PKCγ⁺ en esta última) y lámina III. Barra de escala: 100 μm. (B): Imágenes confocales de la inmunohistoquímica de médula espinal lumbar tras la aplicación de luz en la superficie plantar de una extremidad. Se muestran las astas dorsales de los lados estimulado (ipsilateral) y no estimulado (contralateral) de la misma sección medular, delimitando las láminas más superficiales. Verde: EYFP. Rojo: cFos. Barra de escala: 100 μm. (C): Diagrama que muestra la cuantificación de células cFos⁺ por corte en los lados ipsi y contralateral y en las láminas I y II. Se representa la media de neuronas positivas por corte, las barras de error representan la SEM y cada punto representa el número de neuronas cFos⁺ en un corte. En todos los casos se contabilizaron ambos lados de cada corte (**** = $p < 0.0001$, ANOVA de dos vías seguido de un test de Sidak para comparaciones múltiples). $n = 29$ cortes procedentes de 5 ratones.

En resumen, las neuronas somatosensoriales TRPA1⁺ inervan regiones como la superficie plantar y vísceras como el estómago. La línea transgénica TRPA1-ChR2-EYFP permite su marcaje, caracterizando estas neuronas como nociceptores no peptidérgicos cuya terminación central penetra en la médula espinal hasta la lámina II, y su activación mediante luz induce fundamentalmente comportamientos nocifensivos en el ratón.



BLOQUE II: CARACTERIZACIÓN DE LOS CIRCUITOS INVOLUCRADOS EN LA TRANSMISIÓN DE INFORMACIÓN NOCIVA TÉRMICA EN CONTEXTO AGUDO E INFLAMATORIO

En este segundo bloque de experimentos, se estudiaron los circuitos que se establecen en la médula espinal como primera estación de relevo de la información nociva térmica y cómo estos circuitos están sujetos a modificaciones plásticas en situaciones de inflamación periférica.

4.4. Desarrollo y caracterización del modelo inflamatorio: modelo del CFA

La inyección intraplantar de CFA ha sido ampliamente utilizado como modelo de dolor inflamatorio al dar lugar a una inflamación más prolongada que otros modelos, como el de la carragenina, lo que permite estudiar la evolución del proceso inflamatorio y los cambios plásticos que se suceden (Stein et al. 1988; McCarson y Fehrenbacher 2021). Este es el modelo que elegimos para estudiar los circuitos implicados en la transmisión de información nociva en un contexto inflamatorio.

4.4.1. Evaluación de la sensibilidad mecánica y térmica en el modelo CFA.

Se estudiaron dos grupos de ratones, el tratado con CFA y el grupo control. Al grupo CFA se le administró una única dosis de 10 μ l de CFA mediante una inyección intraplantar en una de las extremidades posteriores, considerada como ipsilateral. La pata contralateral no se inyectó. Al grupo control se le inyectó el mismo volumen de solución salina. Para confirmar el desarrollo de la inflamación, se midió el grosor de ambas patas 3 días antes de la inyección, y 1 y 4 días después. Se consideró el grosor de la pata como la distancia, en milímetros, desde la superficie plantar hasta el dorso de la pata medida en su punto central. Un día después de la inyección de CFA, la inflamación era ya muy evidente en la pata ipsilateral de los ratones del grupo CFA, en

comparación con la contralateral (Fig. 26.A); el grosor de la pata aumentó un 50.4 % respecto al tamaño antes de la inyección (de 2.36 ± 0.03 mm a 3.55 ± 0.08 mm). Cuatro días después de la inyección la inflamación aún era evidente, mientras que la pata contralateral no sufrió ninguna variación de grosor (Fig. 26.B). El grupo control, inyectado con salino, no experimentó cambios en el grosor de su extremidad (Fig. 26.B).

Para valorar si el modelo inflamatorio estaba funcionando correctamente y los animales experimentaban síntomas de hipersensibilidad mecánica, se evaluaron los umbrales mecánicos. La sensibilidad mecánica se estudió mediante el registro de las respuestas a la aplicación de filamentos de von Frey de diferente grosor. Para establecer un valor basal (valores pre), se hicieron estas mediciones una semana antes de la administración de CFA o solución salina únicamente en la pata que iba a ser inyectada, comparándose los porcentajes de respuestas con los obtenidos 4 días después de la inyección (valores post). Previo a la inyección, ambos grupos de ratones mostraron un porcentaje de respuestas a los tres primeros filamentos (0.02, 0.04 y 0.07 g) siempre inferior al 10 %, mientras que tras la inyección con CFA este porcentaje ascendió hasta un 33.3 ± 7.2 % para el filamento de 0.07 g. Uno de los filamentos centrales, el de 0.4 g, produjo respuestas en menos del 50 % de los ensayos antes de la inyección (47.5 ± 8.7 % para “CFA pre”), mientras que después del CFA este porcentaje aumentó hasta un 72.2 ± 9.7 % (Fig. 26.C). *En resumen, se pudo comprobar que la curva de respuesta a los diferentes filamentos se desplaza hacia la izquierda tras la inyección con CFA, lo que significa un incremento en la sensibilidad mecánica.* En el grupo control no se observaron cambios en la sensibilidad mecánica tras la inyección de solución salina. (Fig. 26.C).

Además de la hipersensibilidad mecánica, quisimos comprobar si el modelo CFA desarrolla también hipersensibilidad térmica. Para ello, se empleó el test plantar de Hargreaves, en el cual se proyecta un haz de luz que se enfoca sobre la pata trasera produciendo calor radiante, y se mide el tiempo (latencia) que tarda el animal en retirar la pata (Hargreaves et al. 1988). Se establecieron unas latencias basales para ambos grupos una semana antes de la administración de CFA o solución salina y se compararon con las latencias obtenidas 3 días después de la inyección. Antes de la administración, los valores de latencia para ambos grupos rondaban los 12 segundos (11.8 ± 1.2 s y 12.3 ± 1.0 s para los grupos control y CFA respectivamente). Tres días después de administrar el CFA, la latencia en este último grupo se redujo significativamente hasta los 7.0 ± 1.2 s. En el grupo vehículo, sin embargo, no se produjo ningún cambio en la latencia de respuesta al calor (Fig. 26.D). *Se puede afirmar que la inflamación inducida por CFA produce una hipersensibilidad térmica.*

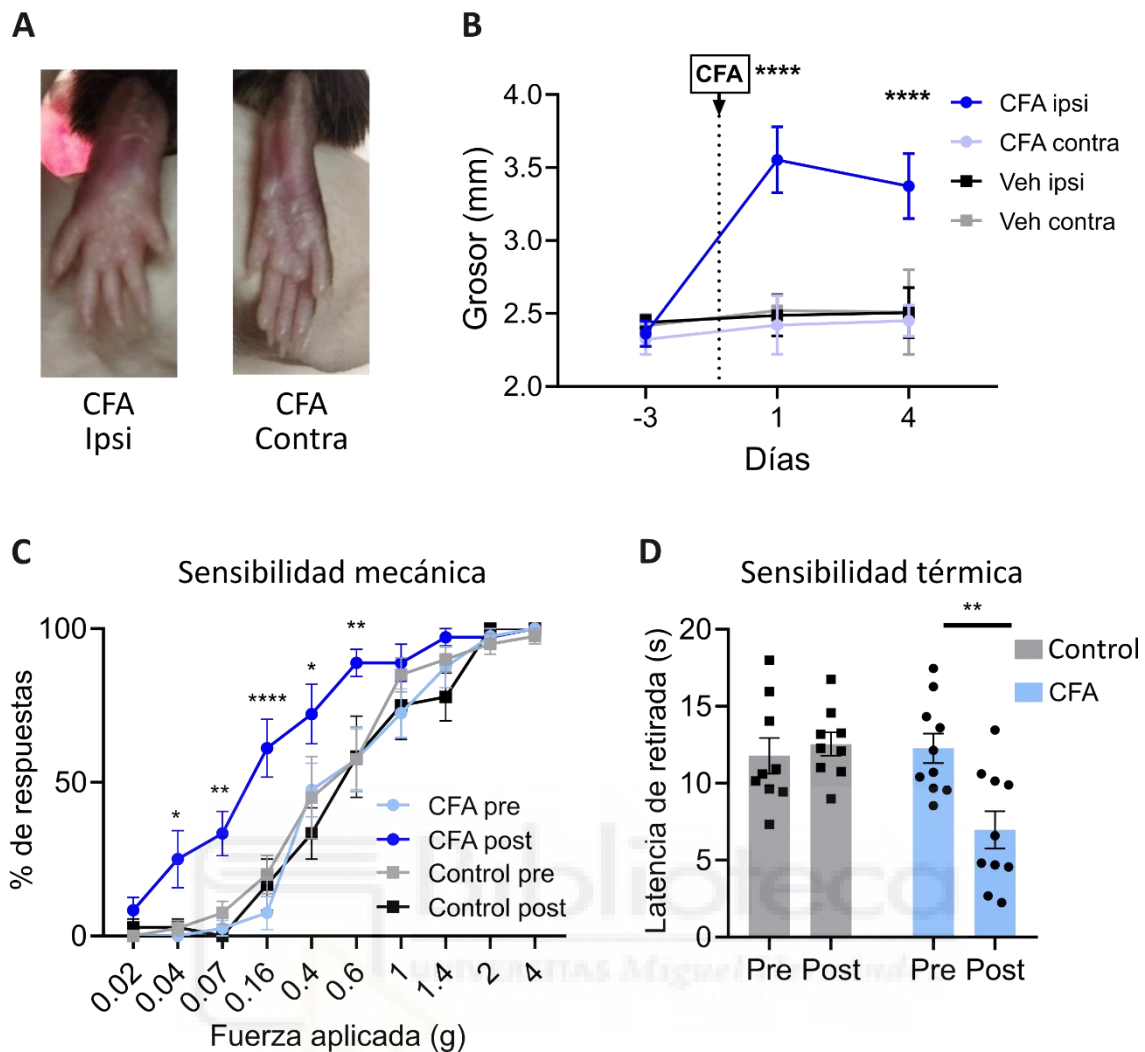


FIGURA 26: Evaluación comportamental de la inducción del modelo inflamatorio CFA. (A): Imágenes representativas de la inflamación de las patas traseras de un ratón, 1 día después de la inyección unilateral de CFA. A la izquierda se muestra la pata que ha recibido el CFA (ipsilateral), a la derecha, la pata intacta (contralateral). (B): Evolución del grosor, en milímetros, de las patas inyectadas (ipsi) y no inyectadas (contra) en los grupos CFA y SS (solución salina). Se consideró como día 0 al día de la inyección. Los puntos representan el grosor medio de las patas, las barras de error representan la SEM y las líneas representan los valores individuales para cada ratón (**** = $p < 0.0001$ para la comparación entre los grupos control ipsi y CFA ipsi para los días 1 y 4, ANOVA de dos vías seguido de un test de Sidak para comparaciones múltiples). $n =$ al menos 3 ratones por cada grupo experimental. (C): Evaluación de la sensibilidad mecánica en el modelo de CFA mediante el registro del porcentaje de respuestas a filamentos de diferentes grosores antes (pre) y después (post) de la inyección de CFA o solución salina. Los puntos representan el porcentaje medio de respuesta a cada filamento y las barras, la SEM (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.005$, **** = $p < 0.0001$ para la comparación entre CFA pre y CFA post, ANOVA de dos vías seguido de un test de Sidak para comparaciones múltiples). (D): Evaluación de la sensibilidad térmica en el modelo de CFA mediante la medición de la latencia de retirada de la pata en el test de Hargreaves antes (pre) y después (post) de la inyección de CFA o solución salina. Las barras representan el tiempo medio de retirada en cada grupo, las barras de error, la SEM, y los puntos,

los valores individuales para cada ratón (** = $p < 0.005$, ANOVA de dos vías seguido de un test de Sidak para comparaciones múltiples). $n =$ al menos 9 ratones por cada grupo experimental.

4.5. Estudio de la activación de cFos en médula espinal tras la estimulación nociva térmica

Una de las herramientas más utilizadas para la identificación de neuronas activas tras la aplicación de un determinado estímulo ha sido la inmunodetección de la proteína cFos (Hunt et al. 1987). En esta tesis hemos utilizado extensamente esta técnica para la identificación de los circuitos involucrados en la transmisión de dolor térmico, así como el modelo de ratón transgénico TRAP2, que se basa en este mecanismo para el marcaje permanente de poblaciones activas. Para ello fue necesario comprender cómo se expresa esta proteína en nuestras condiciones de estimulación.

4.5.1. Identificación del umbral nocivo térmico.

Para identificar los circuitos involucrados en transmisión de dolor térmico, nos preguntamos cuál era la temperatura de estimulación que constituía un estímulo nocivo y que podía activar de manera efectiva las neuronas espinales. Para ello, se llevaron a cabo experimentos con ratones C57BL/6J en una placa caliente cuya temperatura sube a razón de $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y se registró a qué temperatura el ratón empezaba a mostrar signos de dolor, como saltos o retirada o lamida de la pata. Se observó que, tanto en machos como en hembras, y sin existir diferencias significativas entre ellos, la temperatura en la que se empezaron a producir comportamientos aversivos rondaba los $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($45.6 \pm 0.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ para machos y $46.3 \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ para hembras, Fig. 27). Teniendo en cuenta estos resultados y la literatura previa (Vriens et al. 2014), *se establecieron los $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ como temperatura nociva y los $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ como temperatura inocua para las estimulaciones de la superficie plantar.*

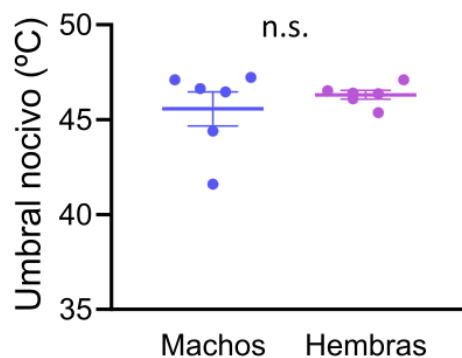


FIGURA 27. Identificación del umbral nocivo de temperatura para machos y hembras. La barra central representa la media, las barras de error representan la SEM y los puntos, los valores individuales para cada animal (n.s. = diferencias no significativas, test de la t de Student) n = 6 ratones de cada sexo.

4.5.2. Expresión de cFos en el asta dorsal de la médula espinal en diferentes condiciones de estimulación con calor nocivo

Para confirmar que la estimulación de la superficie plantar con pulsos de calor nocivo era suficiente para inducir la expresión de cFos en el asta dorsal de la médula espinal, se llevaron a cabo experimentos en ratones C57BL/6J sin anestesiarse a los que se les aplicaron 5, 10 o 20 pulsos de calor de 10 segundos en la superficie plantar con la placa caliente. 90 minutos después, los ratones se sacrificaron y las médulas espinales se extrajeron para realizar la inmunohistoquímica. El objetivo principal fue estudiar si la expresión de cFos en las neuronas de la médula espinal dorsal está relacionada con la intensidad del estímulo aplicado. Además, pretendimos localizar en qué nivel medular lumbar se localizan preferencialmente estas neuronas cFos⁺.

La inmunohistoquímica mostró abundantes núcleos cFos⁺ en las regiones dorsales de la médula espinal en el lado estimulado (ipsilateral), con cualquiera de los tres protocolos aplicados (Fig. 28.A). Se tomaron por tanto las láminas más superficiales, I y II, para los conteos de células positivas. Cuando se comparó el número de neuronas cFos⁺ en el lado ipsilateral respecto del lado contralateral para todos los niveles lumbares, se observó que esta abundancia de marcaje ipsilateral era especialmente significativa en los niveles L4 y L5 para cualquier número de pulsos y en ambas láminas (Fig. 28.B), aunque en los niveles L2, L3 y L6 también se observó mayor marcaje en el lado ipsilateral en alguna de las condiciones de estimulación. *Estos datos coinciden con la literatura, que muestra que los terminales que inervan la superficie*

plantar penetran y establecen sinapsis principalmente en esos niveles medulares (Rigaud et al. 2008), y nos permitió restringir las observaciones a L4 y L5, considerándolos los más relevantes para nuestra investigación.

A continuación, se compararon las diferencias entre el número de células activadas por cada protocolo de estimulación. Se comprobó que, a mayor número de pulsos, el número de células activadas era significativamente mayor (Fig. 28.C), consiguiendo inducir con 20 pulsos más expresión de cFos que con 5 o 10 pulsos. Se decidió utilizar como protocolo estándar los 10 pulsos de calor, administrados en la superficie plantar mediante una placa caliente a 52 °C, para evitar exponer al ratón a estimulaciones excesivas que pudieran ocasionar daños o lesiones severas.



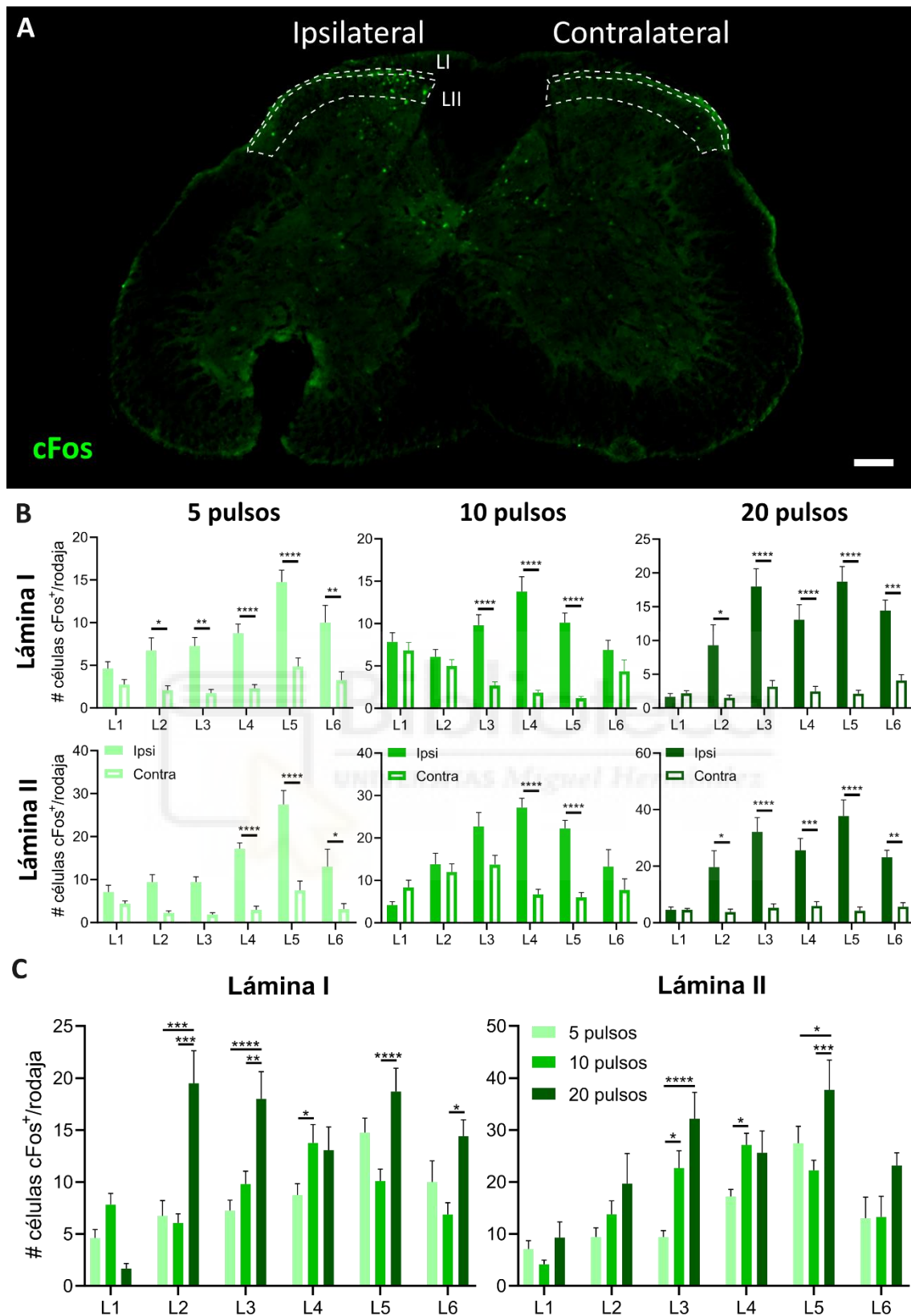


FIGURA 28. Marcaje de cFos en los niveles medulares L1-L6 tras diferentes protocolos de estimulación con calor nocivo en la superficie plantar. (A): Imagen representativa de inmunofluorescencia de un corte medular lumbar L4 tras 10 pulsos de estimulación unilateral con calor nocivo (52 °C). Verde: cFos. Barra de escala: 100 μ m. (B): Comparación entre el número

de neuronas cFos⁺ en el lado estimulado (ipsi) y el no estimulado (contra) para las láminas superficiales I y II, en los distintos niveles medulares L1-L6 y con los tres protocolos de estimulación: 5, 10 y 20 pulsos. Se representa la media y las barras de error representan la SEM (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$, ANOVA de dos vías seguido de un test de Sidak para comparaciones múltiples). (C): Comparación del número de células cFos⁺ en el lado ipsilateral tras diferentes estimulaciones en los niveles medulares L1-L6. Se representa la media y las barras de error representan la SEM (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$, ANOVA de dos vías seguido de un test de Tukey para comparaciones múltiples). $n = 3$ ratones para el protocolo de 5 pulsos y 2 ratones para los protocolos de 10 y 20 pulsos.

4.6. Marcaje permanente de circuitos activados por calor en médula espinal: el ratón TRAP2

Los resultados anteriores demuestran que la tinción de cFos es una herramienta útil para marcar neuronas activas tras una estimulación térmica nociva, pero limitada debido a la expresión transitoria de cFos. Para superar esta limitación, y conseguir marcar estos circuitos de manera permanente con un reportero que permitiera su posterior caracterización y manipulación, empleamos el modelo de animal transgénico TRAP2.

4.6.1. Validación del ratón TRAP2

El ratón TRAP2 expresa una recombinasa Cre dependiente de tamoxifeno bajo el promotor de *cfos*, permitiendo el acceso genético a neuronas que han sido activadas por una experiencia determinada (Allen et al. 2017). En nuestro caso, este acceso genético se consiguió cruzando el ratón TRAP2 con un ratón que contiene el constructo tdTomato *floxeado* (del inglés *floxed* o *flanked by loxP*), resultando un ratón denominado en este trabajo como TRAP2-tdTomato. En este ratón, en heterocigosis para ambos alelos, se expresa la recombinasa Cre en neuronas activas (que expresan cFos), y la administración de hidroxí-tamoxifeno (4-OHT) permite la traslocación de la Cre al núcleo. En el núcleo, ocurre la recombinación entre los sitios loxP que flanquean una secuencia STOP que impide la expresión del tdTomato, activándola (Fig. 10). Para validar la expresión del reportero y certificar que la recombinación (o “aTRAPamiento” de neuronas) sólo ocurre en presencia de 4-OHT, se diseñó un protocolo de “aTRAPamiento” para el marcaje de neuronas activas tras la aplicación de un estímulo térmico nocivo en la pata. Este

protocolo aparece descrito en la sección de Material y Métodos, en el apartado 3.3.2, y se realizó en un grupo de ratones TRAP2-tdTomato aplicando 10 pulsos de calor (52 °C) como estímulo inductor del “aTRAPamiento” (Fig. 29.A). Como control, y para descartar una expresión espuria del reportero tdTomato, se estudió un segundo grupo de ratones TRAP2-tdTomato al que se le realizó el mismo protocolo sustituyendo la inyección de 4-OHT por su vehículo, una mezcla de Kolliphor®EL y solución salina. Tras 7 días, los ratones se sacrificaron y se extrajeron las médulas espinales en su porción lumbar para ser procesadas. Las imágenes de microscopía mostraron que, en el ratón inyectado con 4-OHT, aparecían células tdTomato⁺ en toda la sustancia gris de la médula, pero especialmente abundantes en las capas más superficiales del asta dorsal en el lado que había sido estimulado (ipsilateral). El marcaje en estas células era citoplasmático, distribuyéndose también por las prolongaciones (Fig. 29.B), y la fluorescencia endógena era lo suficientemente intensa como para no tener que utilizar un anticuerpo que potenciara la señal. En cambio, en el grupo que había sido estimulado con el mismo protocolo pero que no había recibido la inyección de 4-OHT, no aparecían células fluorescentes rojas (Fig. 29.B). *Esto indica que la administración de 4-OHT es indispensable para que se produzca la recombinación, y que, en su ausencia, la recombinación es prácticamente inexistente.*

El siguiente paso fue preguntarse en qué tipos celulares ocurría el “aTRAPamiento” para validar esta herramienta como marcadora de circuitos neuronales. Para ello, tras el protocolo de estimulación y el sacrificio 7 días después, se llevó a cabo una inmunohistoquímica con marcadores de células gliales, Iba1 para identificar microglía y GFAP para astrocitos, en la médula espinal. Se comprobó que, en el asta dorsal del lado estimulado, las células tdTomato⁺ aparecían rodeadas y en contacto con otras células positivas para estos marcadores gliales, pero no se apreció co-localización entre ambas señales en ninguna de las secciones analizadas (Fig. 29.C).

Por último, quisimos comprobar si la recombinación ocurría también en neuronas sensoriales de DRG, en cuyo caso se podrían observar fibras tdTomato⁺ penetrando en el asta dorsal de la médula espinal. Tras la estimulación, se extrajeron también los DRG lumbares del lado estimulado y se llevó a cabo una inmunohistoquímica con el marcador neuronal tubulina β III. En este tejido no se observó co-localización entre los marcajes de tubulina y tdTomato, aunque sí se marcaron pequeñas células tdTomato⁺ (Fig. 29.D), tanto en los lados ipsi como contralateral, que podrían corresponder a células glía satélite (Hanani y Spray 2020). *En resumen, nuestros resultados sugieren que, tras la estimulación térmica, la recombinación, y por tanto el “aTRAPamiento”, ocurre únicamente en neuronas.*

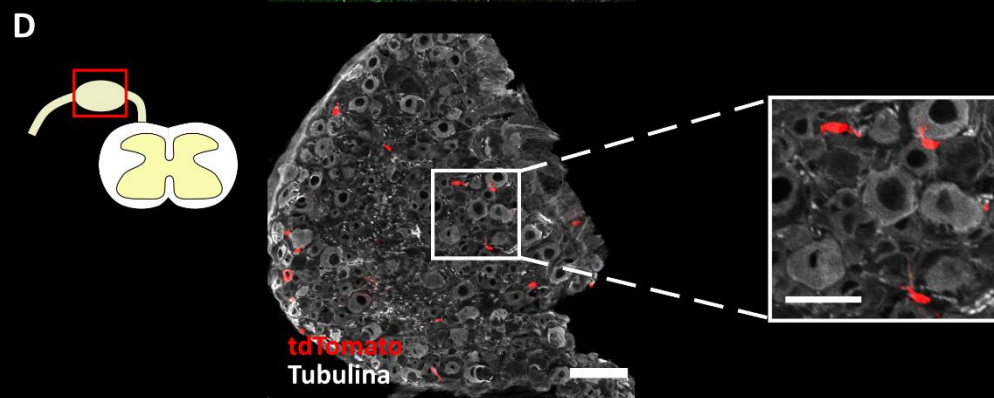
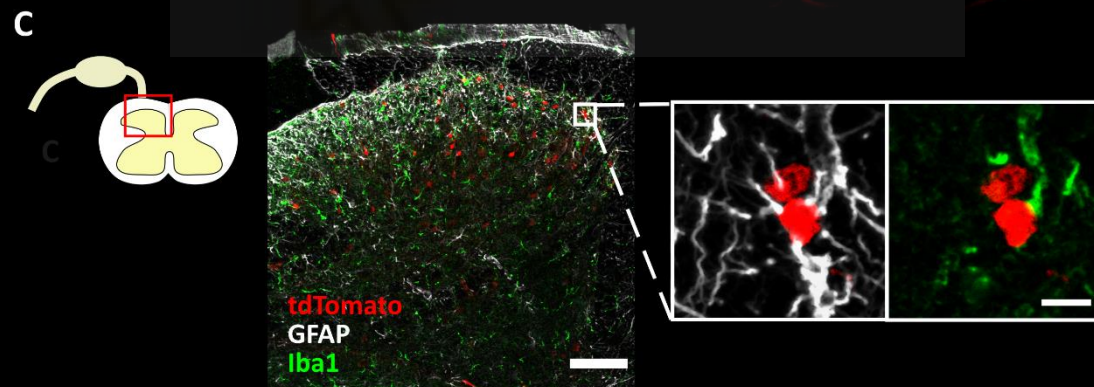
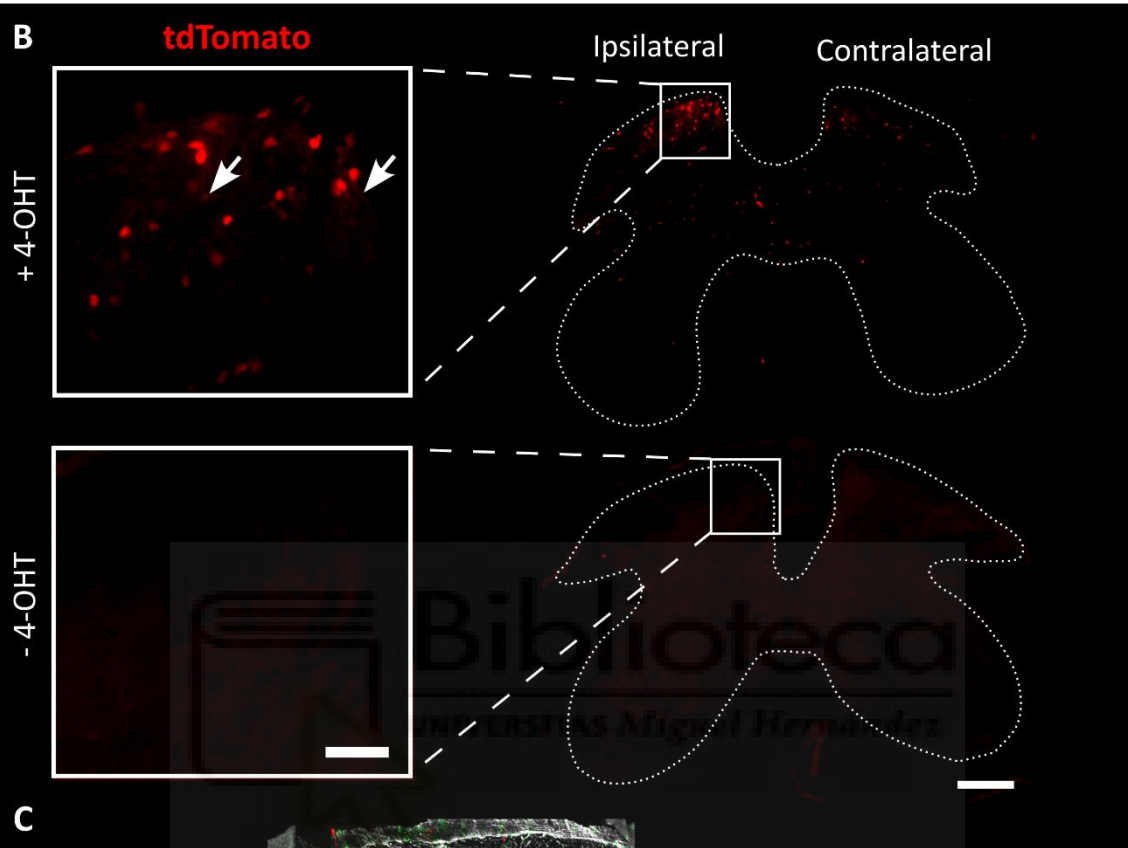


FIGURA 29. Validación del ratón TRAP2 como herramienta para el marcaje permanente de circuitos neuronales activos. (A): Esquema del protocolo de “aTRAPamiento” aplicado. (B): Cortes de médula espinal lumbar de ratones TRAP2-tdTomato estimulados con pulsos de calor nocivo e inyectados con 4-hidroxi-tamoxifeno (+ 4-OHT) o vehículo (- 4-OHT). Rojo: tdTomato, señal de fluorescencia endógena. A la izquierda, detalle del asta dorsal. La flecha indica prolongaciones marcadas con tdTomato. Barras de escala: 200 μ m (derecha), 40 μ m (detalle, izquierda). (C): Imagen de microscopía confocal de la inmunohistoquímica para marcadores gliales en médula espinal de ratones estimulados e inyectados con 4-OHT. Rojo: tdTomato, señal de fluorescencia endógena. Blanco: GFAP (astrocitos). Verde: Iba1 (microglía). A la derecha, detalle de células tdTomato⁺ rodeadas de células gliales. Barras de escala: 100 μ m (izquierda), 10 μ m (detalle, derecha). (D): Imagen de microscopía confocal de la inmunohistoquímica para neuronas sensoriales de DRG de ratones estimulados e inyectados con 4-OHT. Rojo: tdTomato, señal de fluorescencia endógena. Blanco: tubulina β III. Barras de escala: 100 μ m (izquierda), 50 μ m (detalle, derecha). 2 ratones por cada condición (+ 4-OHT y - 4-OHT), 3 rodajas de médula y DRG por condición.

4.6.2. “ATRAPamiento” de circuitos activados por calor en condiciones control y comparación con marcaje cFos. Reactivación de poblaciones.

Una vez comprobamos que el ratón TRAP2 permite el marcaje permanente de neuronas activadas tras un protocolo de estimulación por calor, quisimos comparar ese patrón de marcaje permanente con la señal de cFos medida tras el mismo estímulo. Idealmente, esta pregunta se respondería estudiando el marcaje de tdTomato y cFos en el mismo animal tras una única estimulación, cuantificando las neuronas positivas para ambos marcadores y su co-localización, que debería ser total en el caso de que la recombinación tuviera una eficiencia del 100 %. Sin embargo, los tiempos de expresión de cada una de las proteínas son diferentes, ya que mientras la expresión de cFos decae a las 2 horas de la estimulación (Bullitt et al. 1992), el reportero dependiente de Cre requiere de varios días para expresarse plenamente. Por lo tanto, este ensayo se llevó a cabo en el mismo animal, aplicando dos estímulos idénticos en la extremidad posterior pero separados en el tiempo. Primero, un estímulo térmico en presencia de 4-OHT, para capturar los circuitos activos en ese momento, y 7 días después, una vez el reportero tdTomato se ha expresado plenamente, un segundo estímulo tras el cual el ratón se perfundió y se llevó a cabo la histoquímica para cFos en las porciones lumbares de médula espinal. 24 horas antes del 4-OHT se inyectó solución salina por vía intraplantar, para utilizar este grupo como control frente a un grupo inflamado que se verá más adelante (Fig 30.A).

En primer lugar, se comparó el número de neuronas marcadas en el lado estimulado (ipsilateral) con las marcadas en el no estimulado (contralateral). Para ambos marcajes, tdTomato (neuronas “aTRAPadas” por el primer estímulo) y cFos (neuronas activadas por el segundo), se observó un número significativamente mayor de neuronas en el lado ipsilateral, tanto en lámina I como en lámina II (tdTomato⁺ por rodaja: 3.1 ± 0.5 células en ipsilateral vs 0.4 ± 0.1 células en contralateral en lámina I, y 13.6 ± 1.3 células en ipsilateral vs 3.3 ± 0.3 células en contralateral en lámina II. En el caso del marcaje cFos, se contabilizaron 8.9 ± 0.9 células cFos⁺ por rodaja en el lado ipsilateral vs 2.2 ± 0.4 células en contralateral en lámina I, y 30.6 ± 3.4 células en ipsilateral vs 7.1 ± 0.9 células en contralateral en lámina II, Fig 30.B y C). Esto confirma, como se veía en la Figura 28, que *la expresión del gen cFos es mayoritaria en neuronas de la médula espinal que corresponden al lado estimulado con calor nocivo, y este patrón se mantiene para la expresión de tdTomato.*

En segundo lugar, se observó que, a pesar de que la expresión de ambas proteínas venía inducida por la estimulación con pulsos idénticos de calor nocivo, las neuronas cFos⁺ eran más abundantes que las tdTomato⁺ en ambas láminas, en el lado estimulado, aunque esta diferencia sólo fue significativa para lámina II (lámina I: 8.9 ± 0.9 células cFos⁺/rodaja vs 3.1 ± 0.5 células tdTomato⁺/rodaja. Lámina II: 30.6 ± 3.4 células cFos⁺/rodaja vs 13.6 ± 1.3 células tdTomato⁺/rodaja, Fig. 30.D). Por tanto, en el ratón TRAP2-tdTomato, un primer estímulo consiguió inducir la recombinación o “aTRAPamiento” sólo en una fracción de la población total de neuronas activas en ese momento, si consideramos que el marcaje con cFos sí que identifica al 100 % de la población activa. *Se puede afirmar que las neuronas que expresan tdTomato se “activan” por el estímulo nocivo, pero no toda la población activada expresa este marcador.*

Finalmente, intentamos determinar si las poblaciones activadas por ambos estímulos pertenecen al mismo conjunto de interneuronas. Para ello se midió el grado de co-localización entre la expresión de tdTomato y cFos. Sorprendentemente, entre las neuronas activadas por el primer estímulo, sólo un 39.0 % en LI y un 42.8 % en LII volvían a ser activadas por el segundo estímulo, es decir, expresaban también cFos (32 de 82 células en LI, 140 de 327 células en LII; Fig. 30.E). A su vez, entre las que se activaban por el segundo estímulo, sólo un 15.0 % en LI y un 19.1 % en LII se habían activado también durante el primer estímulo (32 de 214 células en LI, 140 de 734 células en LII, Fig. 30.E). *Esto nos indicó que, a pesar de que existe un cierto grado de solapamiento, los circuitos que integran la información nociceptiva térmica no permanecen estables en el tiempo, y la misma estimulación puede involucrar poblaciones diferentes de interneuronas si se aplica en distintos momentos.*

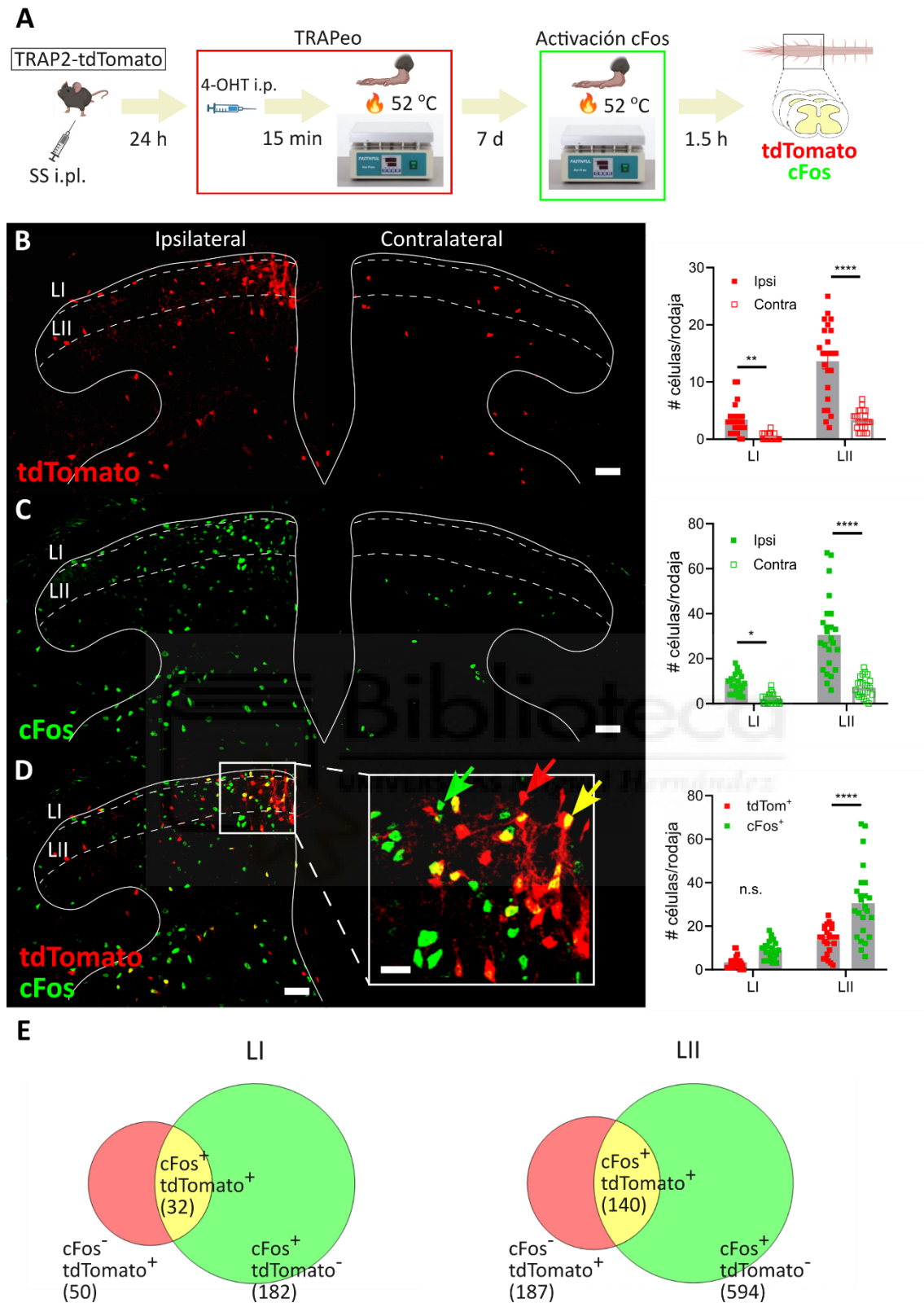


FIGURA 30. Comparación entre la población “aTRAPada” tras un primer estímulo térmico nocivo y el marcaje cFos tras un segundo estímulo idéntico. (A): Esquema del protocolo aplicado. SS: solución salina. (B, C, D): Imagen de confocal representativa de la médula espinal lumbar tras la inmunohistoquímica. En B se muestra el canal rojo (tdTomato) junto con la cuantificación de neuronas tdTomato⁺ en las láminas I y II (histograma), que representan las

neuronas activadas por el primer estímulo. En C se muestra el canal verde (cFos) junto con la cuantificación de neuronas cFos⁺ en las láminas I y II (histograma), que representan las neuronas activadas por el segundo estímulo. En D, superposición de ambos canales para el lado ipsilateral, mostrando en la imagen ampliada neuronas activadas sólo por el primer estímulo (flecha roja), sólo por el segundo (flecha verde) o por ambos (flecha amarilla). En el histograma, se muestra la comparación entre el número de neuronas rojas y verdes en lámina I y II. Los histogramas representan la media, las barras de error representan la SEM y cada punto, el número de células positivas en cada rodaja (n.s.= no significativo, * = $p < 0.05$, **** = $p < 0.0001$, ANOVA de dos vías con test de Sidak para comparaciones múltiples). $n = 4$ ratones, al menos 4 rodajas por ratón. Barras de escala: 50 μm para imágenes a menor aumento, 20 μm para imagen ampliada. (E): Diagramas de Venn que muestran la co-localización de los marcajes tdTomato y cFos observados en las láminas I y II. Entre paréntesis se muestra el número de células de cada grupo.

4.6.3. Comparación de la población activada por calor en condiciones fisiológicas e inflamatorias

A continuación, nos planteamos si, al aplicar calor nocivo en una pata inflamada, la población de neuronas espinales activada es más numerosa que la población activada en condiciones control. Es posible que la hipersensibilidad térmica que observábamos en los experimentos de conducta tras la administración de CFA sea, en parte, consecuencia del reclutamiento de una población más amplia de interneuronas por parte del mismo estímulo.

Para comprobar esta hipótesis, inyectamos un grupo de ratones con CFA en una de sus patas posteriores 24 h antes de aplicar el primer estímulo “aTRAPador”, y reproducimos el protocolo de “aTRAPamiento” y reactivación mostrado en el apartado anterior. A continuación, comparamos el número de neuronas tdTomato⁺ y cFos⁺ entre el grupo control y el grupo CFA (Fig. 31.A). Al comparar estos datos, se observó que ambos grupos presentan en su lado ipsilateral un número similar de neuronas “aTRAPadas” en las láminas superficiales I y II tras la primera estimulación con calor (Lámina I: 3.4 ± 0.5 células tdTomato⁺/rodaja en el grupo control vs 5.7 ± 0.9 células tdTomato⁺/rodaja en el grupo CFA. Lámina II: 13.6 ± 1.3 células tdTomato⁺/rodaja en el grupo control vs 11.4 ± 1.0 células tdTomato⁺/rodaja en el grupo CFA, Fig. 31.B). Ocurre lo mismo con el segundo estímulo de calor, que activa un número similar de neuronas en láminas I y II en condiciones control e inflamatorias (Lámina I: 8.9 ± 0.9 células cFos⁺/rodaja en el grupo control vs 12.9 ± 1.4 células cFos⁺/rodaja en el grupo CFA. Lámina II: 30.6 ± 3.4 células cFos⁺/rodaja en el grupo control vs 36.1 ± 1.9 células cFos⁺/rodaja en el grupo CFA, (Fig. 31.C). Estos resultados sugieren que *la inflamación periférica, al menos en su fase*

aguda, no induce una expansión de la población neuronal de láminas superficiales que recibe la información nociceptiva térmica.

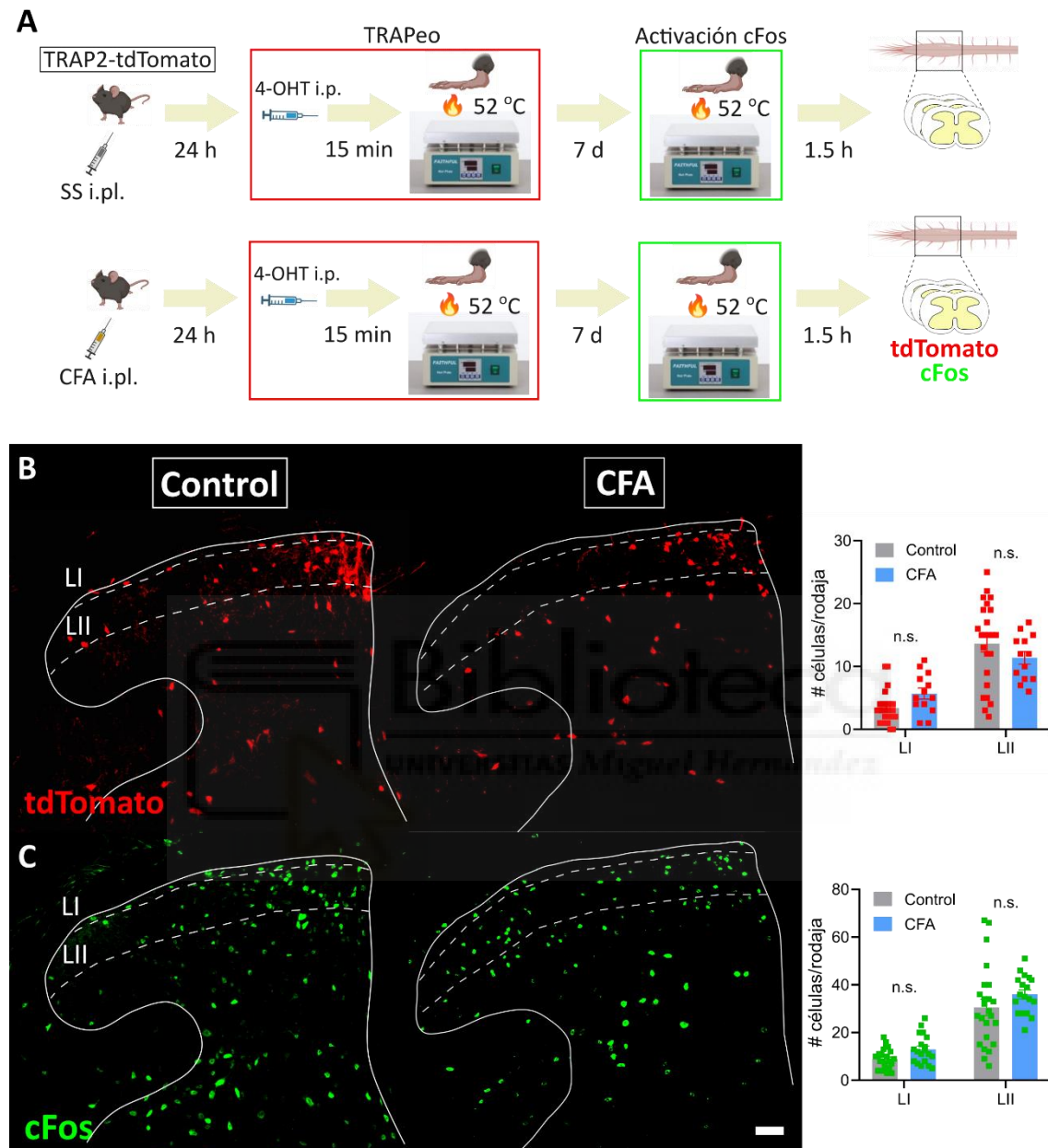


FIGURA 31. Comparación entre la población “aTRAPada” tras un estímulo nocivo térmico en ratones con y sin inflamación plantar. (A): Esquema del protocolo de “aTRAPamiento” y posterior estimulación aplicado en los dos grupos de ratones. (B, C): Comparación entre el marcaje tdTomato (B) y cFos (C) tras la aplicación del estímulo de calor nocivo en condiciones control y en condiciones inflamatorias. A la izquierda se muestran imágenes de microscopía representativas de la médula espinal lumbar en ambos grupos. A la derecha, cuantificación de neuronas tdTomato⁺ o cFos⁺ en láminas I y II en el grupo control y CFA. Se representa la media, las barras de error representan la SEM y cada punto, el número de células positivas en cada corte (n.s. = diferencias no significativas, ANOVA de dos vías con test de Sidak para

comparaciones múltiples). n = 4 ratones por cada grupo, al menos 4 rodajas por cada ratón. Barras de escala: 100 μ m.

4.6.4. “ATRAPamiento” de circuitos activados por calor en condiciones inflamatorias y comparación con marcaje cFos. Reactivación de poblaciones.

A continuación, nos preguntamos si el porcentaje de co-localización que se observa en condiciones control (Fig. 30.E) varía cuando la estimulación se aplica en condiciones inflamatorias, es decir, si los circuitos involucrados en la codificación del dolor térmico en una fase temprana de la inflamación se mantenían en el tiempo y eran los mismos que intervenían ante el mismo estímulo aplicado en una fase tardía de la inflamación. Para ello, se analizó el porcentaje de colocación entre tdTomato y cFos en los ratones del grupo CFA utilizados en el apartado anterior (Fig. 32.A).

Los resultados observados fueron similares a los obtenidos en condiciones control. Tanto para tdTomato como para cFos, el número de neuronas marcadas fue significativamente mayor en el lado inflamado y estimulado, tanto en lámina I como en la II (tdTomato⁺ por rodaja: 5.2 ± 0.7 células en ipsilateral vs 1.2 ± 0.2 células en contralateral en lámina I, y 9.4 ± 1.0 células en ipsilateral vs 3.2 ± 0.5 células en contralateral en lámina II. cFos⁺ por rodaja: 12.9 ± 1.4 células en ipsilateral vs 6.1 ± 0.6 células en contralateral en lámina I, y 36.1 ± 1.9 células en ipsilateral vs 17.8 ± 2.3 células en contralateral en lámina II, Fig 32.B y C). Además, de la misma forma que en el control (i.e. inyección intraplantar de solución salina), las neuronas cFos⁺ eran más abundantes que las tdTomato⁺ para ambas láminas en el lado estimulado (lámina I: 12.9 ± 1.4 células cFos⁺/rodaja vs 5.2 ± 0.7 células tdTomato⁺/rodaja. Lámina II: 36.1 ± 1.9 células cFos⁺/rodaja vs 9.4 ± 1.0 células tdTomato⁺/rodaja, Fig. 32.D).

Se observó que, en este caso, entre las neuronas activadas por el primer estímulo aplicado en la fase aguda de la inflamación, un 44.4 % en LI y un 43.6 % en LII volvían a ser activadas por el segundo estímulo, aplicado en la fase tardía (44 de 99 células en LI, 78 de 179 células en LII). A su vez, entre las que se activaron por el segundo estímulo, un 17.9 % en LI y un 10.7 % en LII se habían activado también durante el primer estímulo (44 de 246 células en LI, 78 de 732 células en LII, Fig. 32.E). Por lo tanto, concluimos que, *tanto en condiciones fisiológicas como inflamatorias, los circuitos que integran la información nociceptiva térmica son plásticos y varían en el tiempo.*

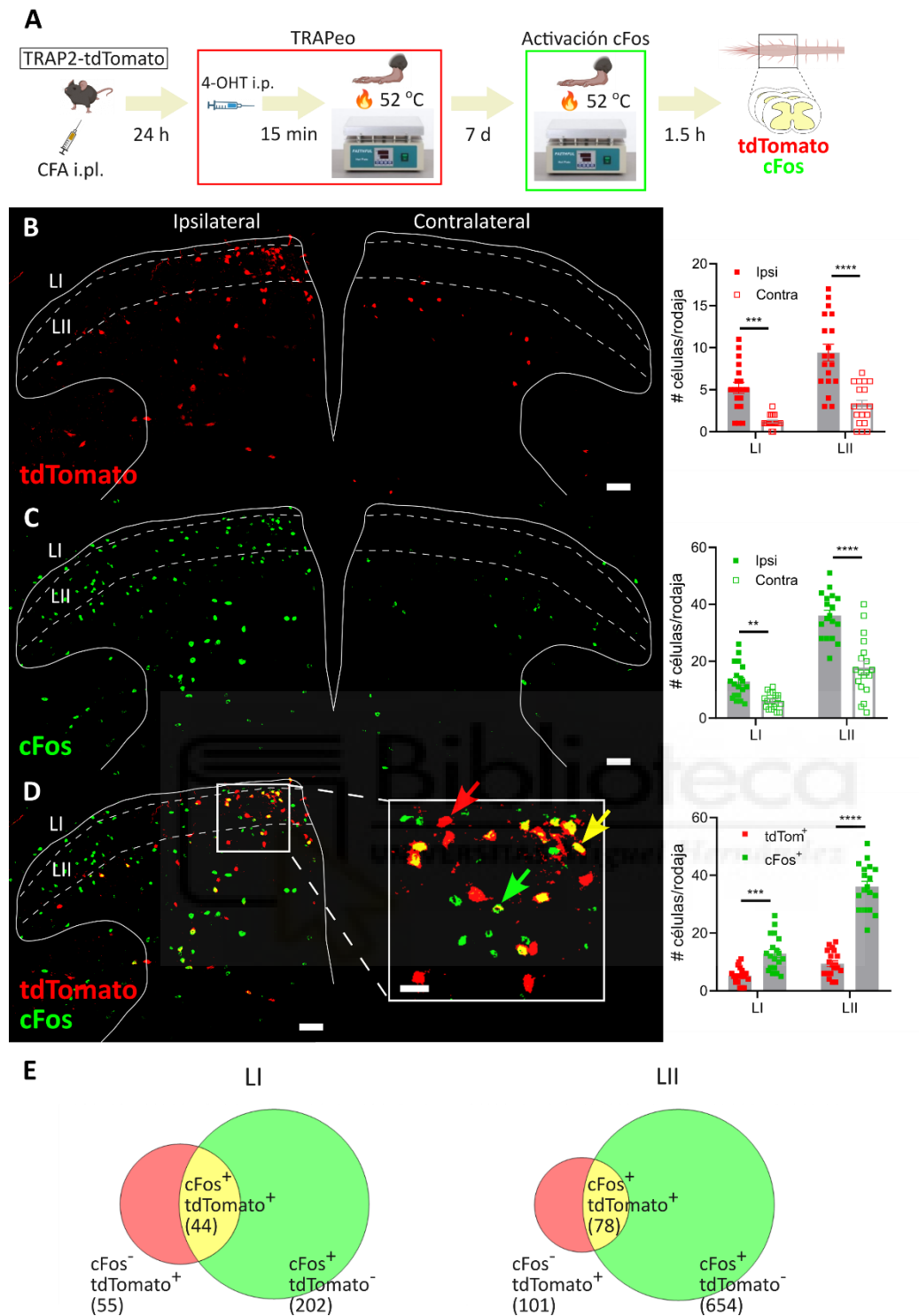


FIGURA 32. Comparación entre la población “aTRAPada” tras un primer estímulo térmico nocivo en fase temprana de la inflamación y el marcaje cFos tras un segundo estímulo idéntico en fase tardía de la inflamación. (A): Esquema del protocolo aplicado. (B, C, D): Imagen de confocal representativa de la médula espinal lumbar tras la inmunohistoquímica. En B se muestra el canal rojo (tdTomato) junto con la cuantificación de neuronas tdTomato⁺ en las láminas I y II (histograma), que representan las neuronas activadas por el primer estímulo. En C se muestra el canal verde (cFos) junto con la cuantificación de neuronas cFos⁺ en las láminas I y II (histograma), que representan las neuronas activadas por el segundo estímulo. En D,

superposición de ambos canales para el lado ipsilateral, mostrando en la imagen ampliada neuronas activadas sólo por el primer estímulo (flecha roja), sólo por el segundo (flecha verde) o por ambos (flecha amarilla). En el histograma, se muestra la comparación entre el número de neuronas rojas y verdes en lámina I y II. Los histogramas representan la media, las barras de error representan la SEM y cada punto, el número de células positivas en cada rodaja (* = $p < 0.05$, **** = $p < 0.0001$, ANOVA de dos vías con test de Sidak para comparaciones múltiples). $n = 4$ ratones, al menos 4 rodajas por ratón. Barras de escala: 50 μm para imágenes a menor aumento, 20 μm para imagen ampliada. (E): Diagramas de Venn que muestran la co-localización de los marcajes tdTomato y cFos observados en las láminas I y II. Entre paréntesis se muestra el número de células de cada grupo.

4.6.5. Reactivación de poblaciones neuronales sensibles a estímulos nocivos tras la aplicación de un segundo estímulo inocuo en un contexto inflamatorio

Otra cuestión que nos planteamos fue si las poblaciones que se activan cuando se aplica un estímulo inocuo que se percibiría como nocivo por el contexto inflamatorio (alodinia), son las mismas que las que se activan tras la administración del estímulo nocivo agudo. Para ello, se diseñó un protocolo en el que en primer lugar se “aTRAParon” las neuronas activas tras un estímulo nocivo térmico agudo unilateral. 4 días después, se administró solución salina o CFA intraplantar, y a los tres días se aplicaron 10 pulsos de calor inocuo (placa caliente a 42 °C) en ambos grupos (Fig. 33.A). 1.5 horas después se perfundieron los ratones y se llevó a cabo la inmunohistoquímica para la detección de cFos en médula espinal.

En primer lugar, se analizó el número de neuronas cFos⁺ en las astas superficiales del lado estimulado, comprobando que el número de éstas tras una estimulación nociva aguda (datos recogidos anteriormente en la Figura 28), no difiere significativamente del número de neuronas que expresan cFos tras una estimulación de calor inocuo en un contexto inflamatorio (CFA + Calor inocuo, Fig. 33.B). En cambio, el número de neuronas cFos⁺ en la lámina II del lado ipsilateral es significativamente menor cuando el estímulo inocuo se administra en condiciones fisiológicas (Control + Calor inocuo, Fig. 33.B).

En segundo lugar, se estudió el porcentaje de neuronas que se habían activado tras el estímulo térmico nocivo agudo (neuronas tdTomato⁺) que además se reactivaron por el estímulo inocuo en ambos contextos. Este porcentaje, calculado en función del grado de colocación de ambos marcadores, es muy bajo en ambas láminas para el contexto fisiológico, 4.5 % y 6.5 % para LI y LII respectivamente, ocurriendo lo mismo en el contexto inflamatorio, obteniendo un

3.4 % y un 10.2 % para las mismas láminas (2 de 44 células en LI y 10 de 155 células en LII para el grupo control, 2 de 58 células en LI y 21 de 206 células en LII para el grupo CFA, Fig. 33.C). Esto nos indicó que la información térmica inocua, percibida como tal en el ambiente fisiológico y como un estímulo nocivo (alodinia) en el ambiente inflamatorio, es integrada por circuitos diferentes a los que intervienen durante la codificación de la información nociva aguda en la médula espinal.

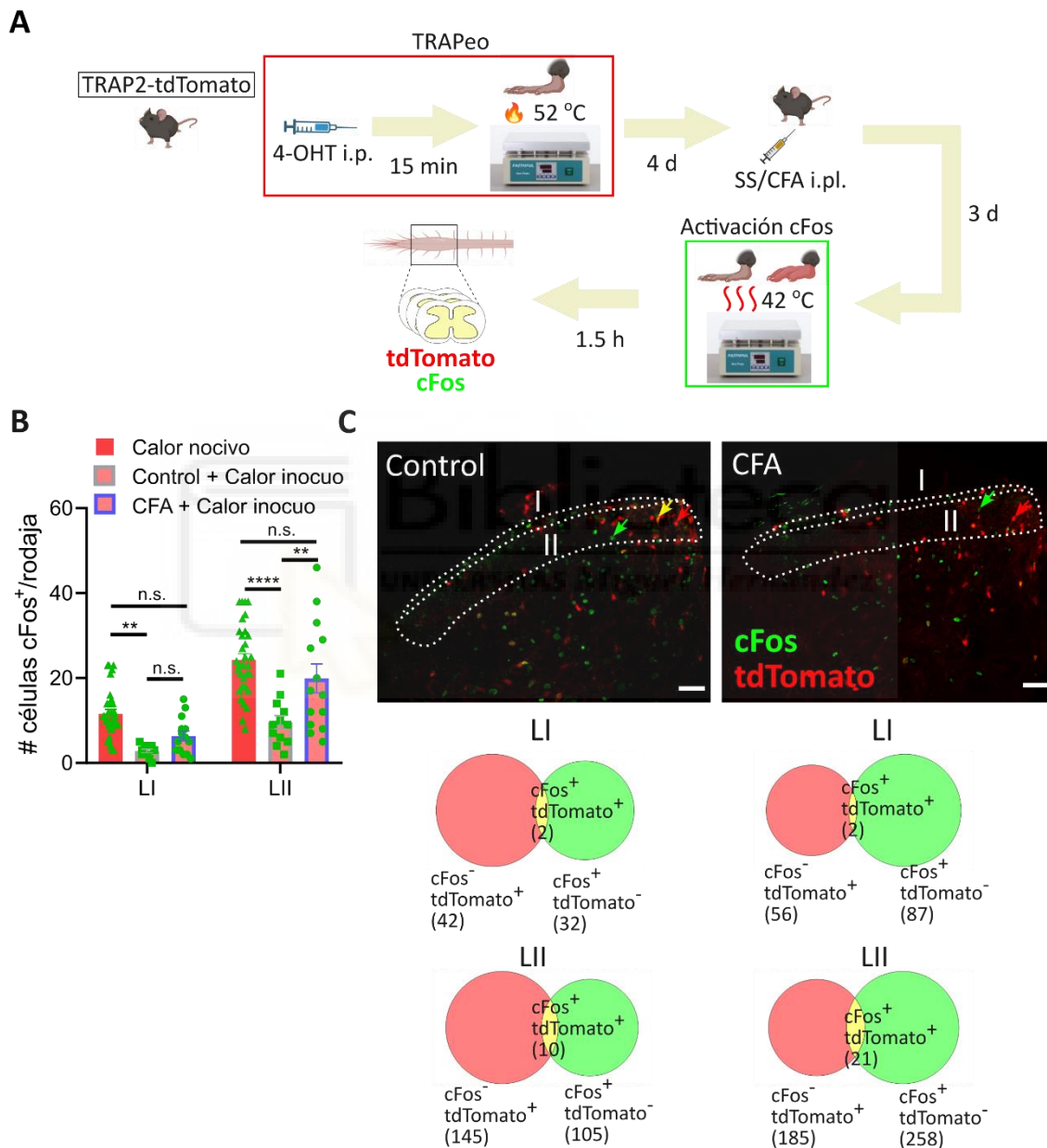


FIGURA 33. Reactivación de los circuitos involucrados en transmisión de calor nocivo durante la administración de un estímulo inocuo en condiciones control e inflamatorias. (A): Protocolo de “aTRAPamiento” y reactivación de circuitos. **(B):** Comparativa del número de neuronas cFos⁺ en astas dorsales de la médula espinal tras la estimulación con calor nocivo (datos de la Figura

28.B) y con calor inocuo en condiciones control e inflamatorias. Se representa la media, las barras de error representan la SEM y cada punto, el número de células positivas en cada corte. (C, arriba): Imágenes de fluorescencia de la parte superficial de un corte lumbar de médula en su lado ipsilateral a la estimulación tras aplicar el protocolo de reactivación y la subsiguiente inmunohistoquímica para cFos en ambos grupos de ratones. Las flechas verdes, rojas y amarillas muestran neuronas $cFos^+/tdTomato^-$, $cFos^-/tdTomato^+$ y $cFos^+/tdTomato^+$ respectivamente. Verde: cFos. Rojo: tdTomato. Barras de escala: 50 μm . (C, abajo): Diagramas de Venn que muestran la co-localización de los marcajes tdTomato y cFos observados en las láminas superficiales I y II en ambos grupos de ratones. Entre paréntesis se muestra el número de células de cada grupo. Se contabilizaron y agruparon todas las células presentes en al menos 5 cortes/ratón, $n = 2$ ratones.

4.7. Caracterización funcional de las poblaciones de interneuronas espinales activadas por estímulos térmicos

Como mostramos en el apartado anterior, la herramienta TRAP2 nos permite marcar de manera permanente una población de interneuronas espinales que se activaban al aplicar calor nocivo a la superficie plantar. Demostramos además que, cuando este estímulo nocivo se aplica sobre una pata inflamada, el número de neuronas espinales activadas no aumenta. A continuación, abordamos, mediante registros electrofisiológicos, la caracterización funcional de esta población de neuronas “aTRAPadas” sensibles al calor nocivo.

4.7.1. Modificaciones funcionales en médula espinal inducidas por la inflamación con CFA

Tras confirmar que el modelo inflamatorio de CFA inducía una hipersensibilidad tanto térmica como mecánica, nos preguntamos si esta percepción exagerada de los estímulos externos tiene como causa un cambio en las propiedades de las interneuronas de la médula espinal que integran la información procedente de los aferentes que detectan esos estímulos, un proceso conocido como sensibilización central (Latremliere y Woolf 2009). Nos centramos en caracterizar las propiedades intrínsecas de las interneuronas de la lámina II, que es la capa donde los nociceptores establecen mayoritariamente su primera sinapsis (Polgár, Sardella, et al. 2013; Peirs y Seal 2016). Para ello, se inyectó CFA a ratones de la línea TRAP2-tdTomato (grupo

CFA) y con solución salina (grupo control) en la pata posterior izquierda. Un día después se les aplicó un estímulo de calor nocivo (52 °C) en la pata inyectada y se les administró 4-OHT para “aTRAPar” neuronas espinales que respondiesen a calor. 7 días después, una vez el reportero se hubo expresado plenamente, se sacrificaron para realizar el registro electrofisiológico de las neuronas en el asta dorsal de la porción lumbar de la médula espinal, únicamente en el lado de la inyección de CFA o solución salina (Fig. 34). Se registraron células tdTomato⁺ (sensibles a calor) y tdTomato⁻ (insensibles a calor), aunque en este primer apartado se presentan los resultados obtenidos atendiendo únicamente a si las células procedían de una rodaja perteneciente o no a un ratón tratado con CFA. La caracterización funcional de las neuronas marcadas y no marcadas con el reportero se detallará en el siguiente apartado.

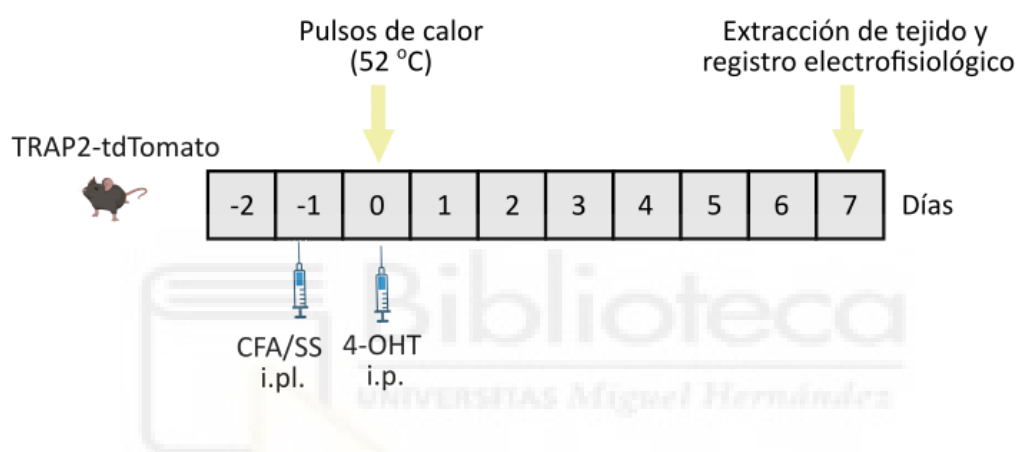


FIGURA 34. Protocolo de inducción de inflamación y “aTRAPamiento” de neuronas sensibles a calor para el posterior registro electrofisiológico en rodajas de médula espinal. SS: Solución salina. i.pl.: intraplantar. i.p.: intraperitoneal. 4-OHT: 4-hidroxi-tamoxifeno.

En primer lugar, nos fijamos en el potencial de membrana en reposo (RMP, por sus siglas en inglés) de estas interneuronas en ambos grupos de ratones, característica que puede influir en la excitabilidad neuronal (Tashima et al. 2021). Sin embargo, constatamos que no existen diferencias significativas en el potencial de reposo en neuronas de lámina II tras la inflamación: -52.1 ± 1.1 mV en el grupo control frente a -53.6 ± 1.3 mV en el grupo CFA, Fig. 35.A. Durante la medición del potencial de membrana en reposo, se constató que estas células sólo excepcionalmente presentan actividad espontánea en forma de potenciales de acción, condición que no se ve modificada tras la inducción de la inflamación periférica.

A continuación, determinamos la corriente reobase de estas neuronas. Se entiende como reobase a la mínima amplitud de corriente que es capaz de activar una neurona (Arle y Shils 2022). Para ello, se aplicaron pulsos de corriente creciente (+ 20 pA por pulso) en fijación de

corriente y se midió la variación de voltaje, identificando la corriente mínima que era capaz de provocar al menos un potencial de acción. Una menor reobase sería indicativa de una mayor excitabilidad. No obstante, tampoco se observaron diferencias significativas entre la reobase de las interneuronas del grupo vehículo y las del grupo CFA (64.9 ± 5.4 pA vs 59.6 ± 6.4 pA, Fig. 35.B). *Podemos afirmar por tanto que la inflamación por CFA no afecta al RMP ni a la reobase de las interneuronas de lámina II de la médula espinal.*

Otra de las propiedades biofísicas que estudiamos fue el patrón de disparo de estas neuronas tras la inyección de corriente, para comprobar si la inflamación periférica producía algún cambio. Se constató que los patrones mayoritarios de disparo eran el tónico (T) y el inicial (I), ya que más del 70 % de las neuronas en ambos grupos disparaban de una de estas dos maneras. En el grupo control, el patrón de disparo mayoritario fue el inicial, con un 36.2 % de las neuronas disparando de esta manera, mientras que en el grupo CFA fue el tónico, con un 43.1 % (Fig. 35.C, D). Aún así, podemos afirmar que *la inflamación con CFA no induce un cambio significativo en el patrón de disparo de las neuronas de lámina II.*



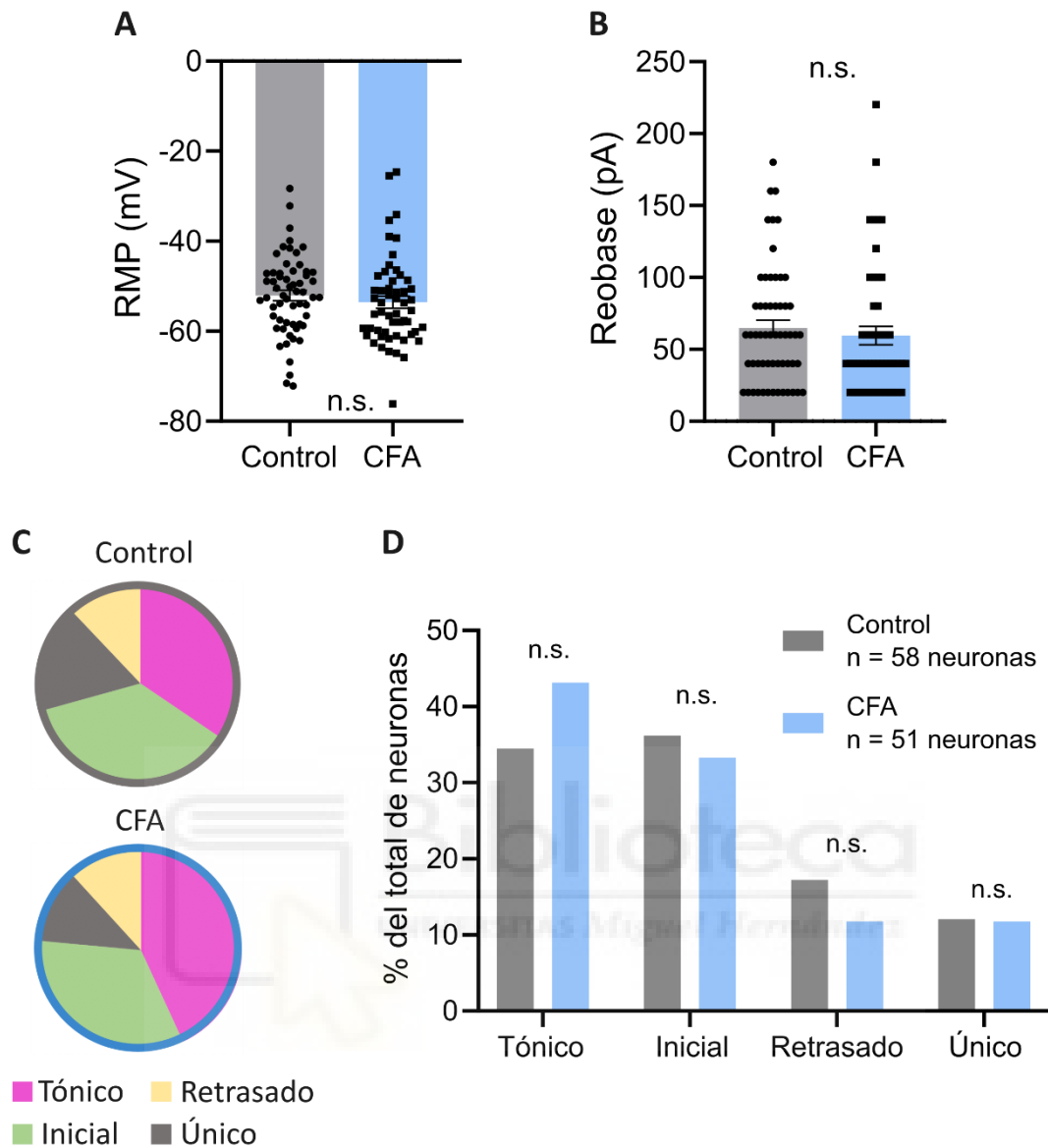


FIGURA 35. Caracterización de las propiedades biofísicas de las neuronas espinales de lámina II en condiciones control y en inflamación. (A, B): Potencial de membrana en reposo (RMP, A) y corriente rebase (B) para ambos grupos. Se representa la media, las barras de error representan la SEM y cada punto representa una célula (n.s. = diferencias no significativas, test de Mann-Whitney). (C): Representación de la proporción de neuronas que responden a la inyección de corriente con cada patrón de disparo en los grupos control y CFA. (D): Comparación entre los patrones de disparo en los grupos control y CFA (n.s. = diferencias no significativas, test exacto de Fisher). n = 6 ratones por grupo experimental.

Tras determinar que el potencial de membrana en reposo, la rebase y el patrón de disparo de las neuronas de lámina II no se ven modificados en condiciones inflamatorias, nos preguntamos si existe algún otro mecanismo de sensibilización central que esté activándose en esta región de la médula espinal y que pueda contribuir a la facilitación de la transmisión de

información nociceptiva. Un posible mecanismo es un input sináptico excitatorio aumentado sobre estas neuronas. Para ello se registraron durante 2 minutos las corrientes excitatorias postsinápticas espontáneas (sEPSC por sus siglas en inglés) en modo fijación de voltaje y fijando el potencial de membrana a -70 mV (Fig. 36.A). Se observó que la frecuencia con la que ocurrían estos eventos se veía incrementada en el grupo inyectado con CFA (0.77 ± 0.11 Hz en el grupo control vs 1.32 ± 0.24 Hz en el grupo CFA, Fig. 36.C). También aumentó la amplitud de estas corrientes, que pasó de -13.4 ± 0.6 pA en el grupo control a -16.8 ± 1.0 pA en el grupo CFA (Fig. 36.B, D). La constante de tiempo de inactivación de estas corrientes (τ) no varió significativamente entre ambos grupos (Fig. 36.E). *Todos estos datos indican que la inflamación provocada por la inyección de CFA induce un aumento del input excitatorio espontáneo sobre las interneuronas de lámina II.*



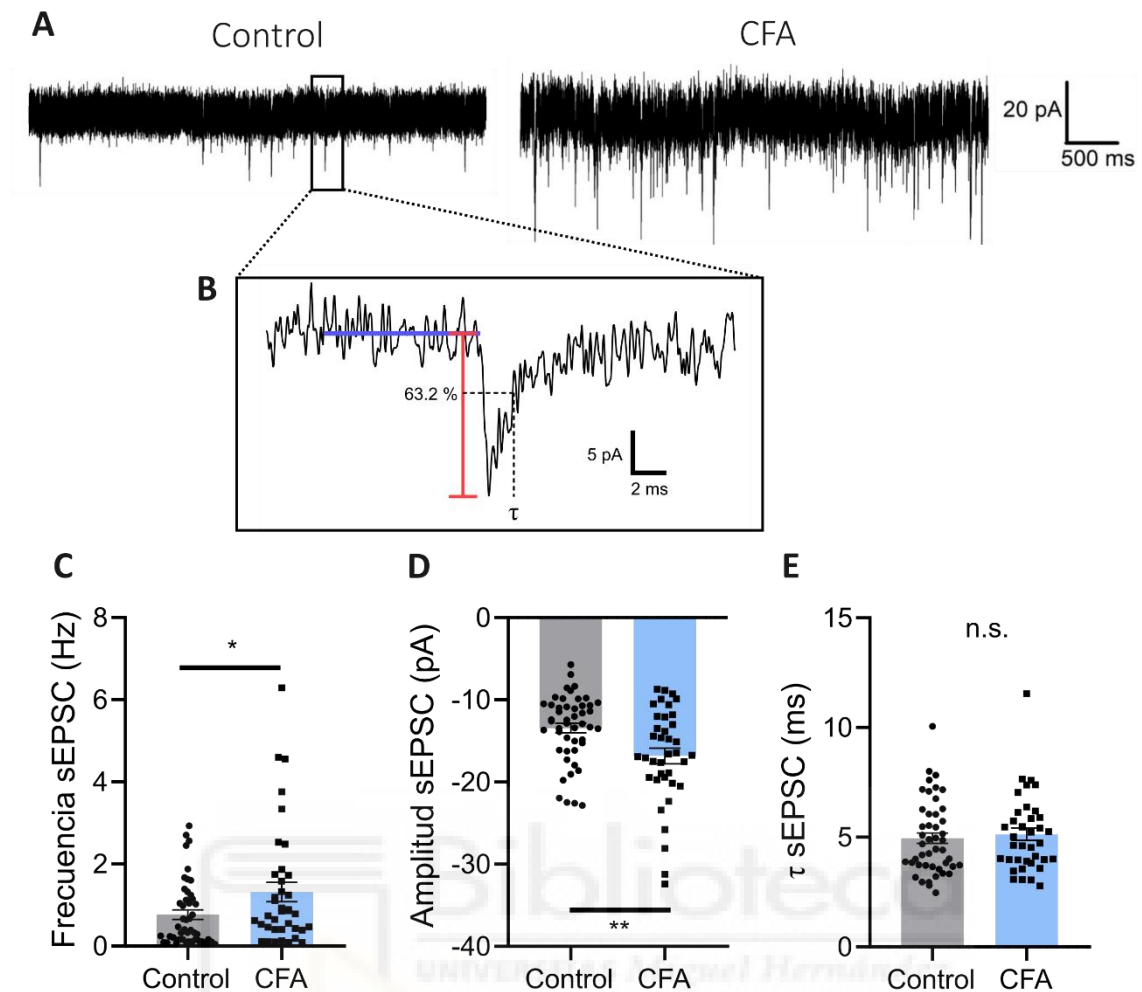


FIGURA 36. Caracterización de las corrientes excitatorias postsinápticas (sEPSC) de interneuronas de lámina II en condiciones control e inflamatorias. (A): Trazos representativos de la corriente en modo fijación de voltaje a -70 mV en una neurona espinal de ratón inyectado con solución salina (izquierda) y de uno inyectado con CFA (derecha). (B): Detalle de una corriente excitatoria postsináptica. Se representa en azul la línea base y en rojo la amplitud. La tau (τ) o constante de tiempo de inactivación indica el tiempo necesario para que la corriente alcance el 63.2 % de la amplitud alcanzada tras la activación. (C): Frecuencia con la que se observan los sEPSC en ambos grupos. Se representa la media, las barras de error representan la SEM y cada punto representa una neurona (* = $p < 0.05$, test de Mann-Whitney). (D): Amplitud media de la corriente sináptica espontánea observada en cada neurona, en ambos grupos y en valores negativos por representar corrientes de entrada. Se representa la media, las barras de error representan la SEM y cada punto representa la media de las amplitudes de todas las corrientes de una única neurona (** = $p < 0.01$, test de Mann-Whitney). (E): Constante de tiempo de inactivación (τ) de las corrientes espontáneas en ambos grupos. Se representa la media, las barras de error representan la SEM y cada punto representa la media de las τ de todas las sEPSCs de una única neurona (n.s. = diferencias no significativas, test de Mann-Whitney). $n = 6$ ratones por grupo experimental.

4.7.2. Caracterización funcional de las neuronas tdTomato⁺ y tdTomato⁻ en condiciones control e inflamatorias

A continuación, se reanalizaron los resultados del apartado anterior, dependiendo de la pertenencia de las neuronas a los grupos control o inflamado, y se clasificaron en función de su marcaje tdTomato, es decir, si eran neuronas activadas por calor nocivo o no.

En primer lugar, se estudió tanto el potencial de membrana en reposo (RMP) como la corriente reobase, constatándose que no existían diferencias significativas en estos parámetros entre las neuronas tdTomato⁻ y las tdTomato⁺ en ninguno de los dos grupos, control y CFA (Fig. 37.A). Se analizó el patrón de disparo, clasificando las neuronas según el patrón de descarga de potenciales de acción tras la inyección de corriente (Fig. 13). No se encontraron diferencias significativas en la proporción de neuronas tdTomato⁻ o tdTomato⁺ que pertenecen a cada patrón de disparo en los grupos control y CFA por separado (Fig. 37.B, C). Sin embargo, se observó una tendencia en las neuronas tdTomato⁺ a disparar mayoritariamente con un patrón tónico en ambos grupos, control y CFA. Cuando se analizaron los datos de los dos grupos experimentales de manera conjunta, se apreció una diferencia significativa en la proporción de neuronas de disparo tónico, siendo este patrón más frecuente entre las neuronas tdTomato⁺ (46.9 % de las tdTomato⁺ vs 26.7 % de las tdTomato⁻, Fig. 37.D). *Los resultados indican que las interneuronas espinales sensibles a calor nocivo tienden a presentar un patrón de disparo tónico, tanto en condiciones fisiológicas como inflamatorias.*

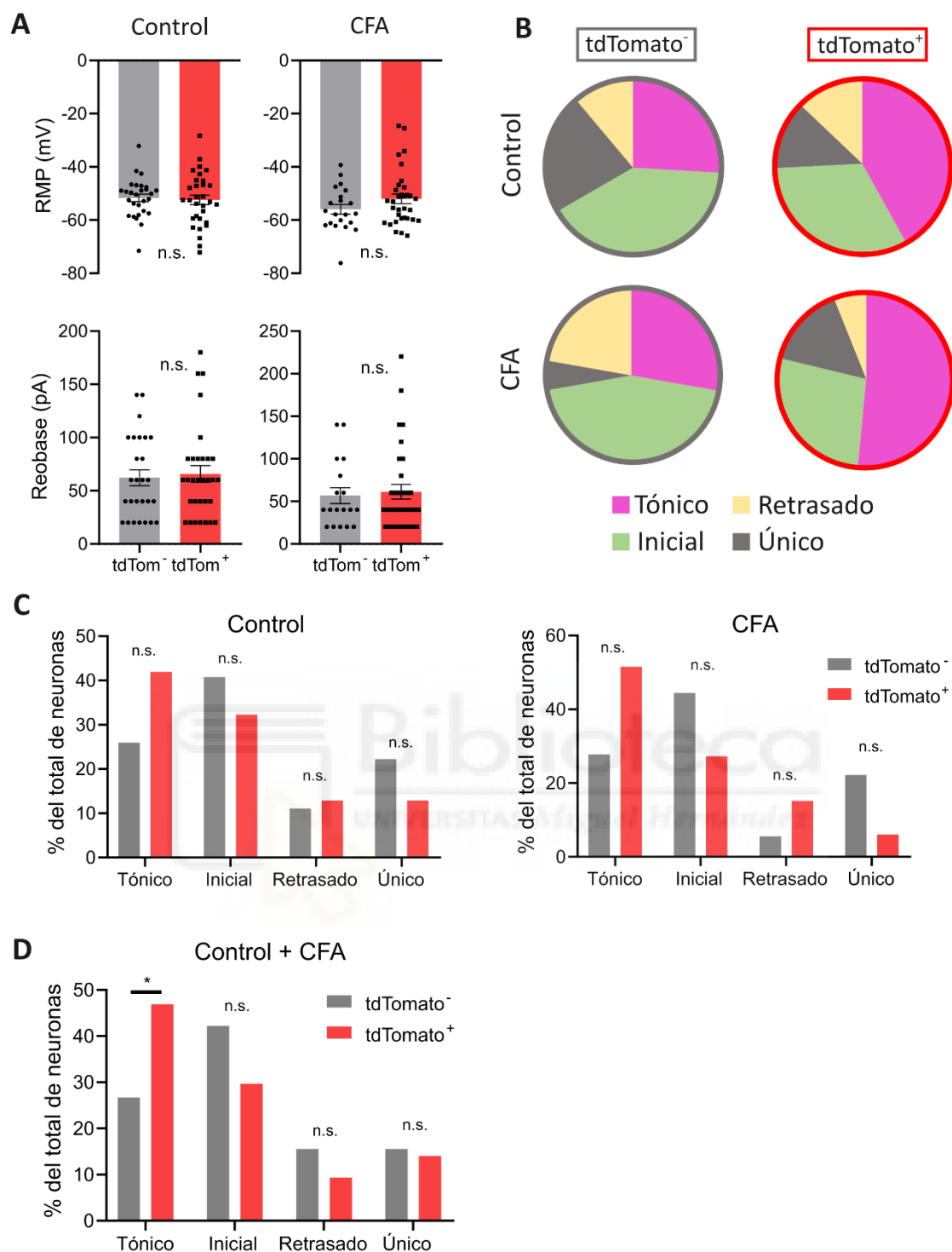


FIGURA 37. Caracterización de las propiedades biofísicas de las neuronas espinales tdTomato⁻ y tdTomato⁺ de lámina II en condiciones control y en inflamación. (A): Potencial de membrana en reposo (RMP) y reobase para las neuronas tdTomato⁻ y tdTomato⁺ de ambos grupos experimentales, control y CFA. Se representa la media, las barras de error representan la SEM y cada punto representa una célula (n.s. = diferencias no significativas, test de Mann-Whitney). (B): Representación de la proporción de neuronas tdTomato⁻ y tdTomato⁺ que responden a la inyección de corriente con cada patrón de disparo en los grupos control y CFA. (C): Comparación entre los patrones de disparo de las neuronas tdTomato⁻ y tdTomato⁺ en los grupos control y

CFA (n.s. = diferencias no significativas, test exacto de Fisher). (D): Comparación entre los patrones de disparo de las neuronas tdTomato⁻ y tdTomato⁺ tomando en conjunto los datos de ambos grupos experimentales, control y CFA (* = $p < 0.05$, test exacto de Fisher). $n = 6$ ratones

Posteriormente, se analizó la amplitud, frecuencia y constante de tiempo de inactivación (τ) de las corrientes espontáneas excitatorias (sEPSC) presentes en ambas poblaciones. Ya habíamos mostrado que la inflamación provocada por CFA induce un aumento en la frecuencia y la amplitud de estas corrientes en las neuronas espinales de lámina II (Fig. 36.C, D). Quisimos además estudiar si existían diferencias en estos parámetros entre neuronas tdTomato⁻ y tdTomato⁺ en ambas condiciones. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la frecuencia, amplitud ni τ de las sEPSCs que presentan ambas poblaciones, ni en condiciones control (Fig. 38.A) ni en inflamación (Fig. 38.B). *Estos resultados sugieren que el input excitatorio que reciben las neuronas de médula espinal sensibles a calor no es diferente al que reciben las neuronas que no se han marcado tras este estímulo.*



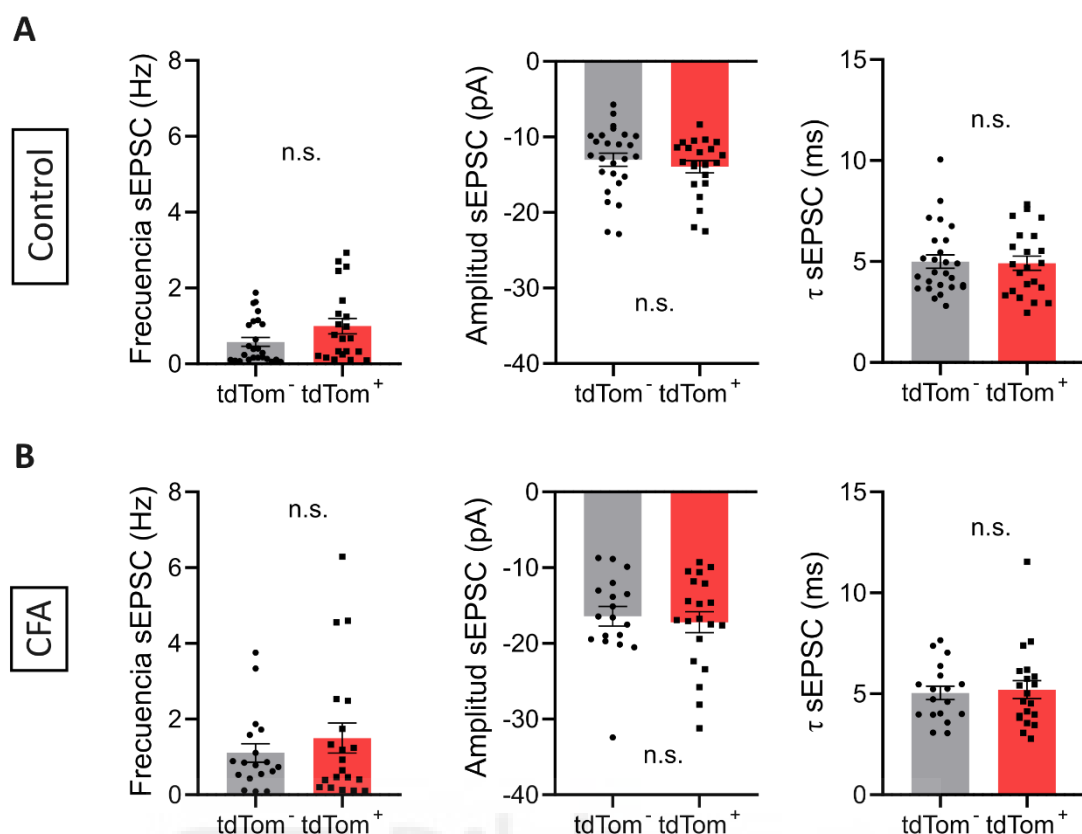


FIGURA 38. Caracterización de las corrientes excitatorias postsinápticas (sEPSC) de interneuronas tdTomato⁻ y tdTomato⁺ de la lámina II en condiciones control y de inflamación. (A, B): Comparación de la frecuencia con la que se observan los eventos, amplitud media y constante de inactivación (τ) de los mismos entre neuronas tdTomato⁻ y tdTomato⁺ en condiciones control (A) y de inflamación (B). Se representa la media, las barras de error representan la SEM y cada punto representa una neurona. En el caso de la amplitud y la τ , cada punto representa la media de todas las amplitudes y de todas las τ respectivamente para una única neurona (n.s. = diferencias no significativas, test de Mann-Whitney). n = 6 ratones por grupo experimental.

Por último, analizamos las diferencias en el potencial de membrana en reposo, la corriente reobase, el patrón de disparo y los sEPSC en las neuronas sensibles a calor nocivo (tdTomato⁺), en condiciones control e inflamatorias. Anteriormente demostramos que la inflamación provocaba un aumento de la frecuencia y amplitud de los sEPSC sin afectar a su tau ni al resto de propiedades biofísicas en el conjunto de neuronas de médula espinal. Circunscribiéndonos a las tdTomato⁺, observamos que la inflamación no altera su potencial de membrana en reposo (Fig. 39.A) su corriente reobase (Fig. 39.B) ni su patrón de disparo (Fig. 39.C). Sin embargo, sí que provoca un aumento de la amplitud de los sEPSC en estas neuronas (Fig. 39.E), sin afectar significativamente a su frecuencia (Fig. 39.D) ni a su tau (Fig. 39.F), aunque se observa una

tendencia al alza en la frecuencia. Por lo tanto, se puede afirmar que la inflamación inducida por CFA provoca un aumento en la magnitud de los inputs excitatorios que reciben las neuronas sensibles a calor nocivo de médula espinal dorsal.

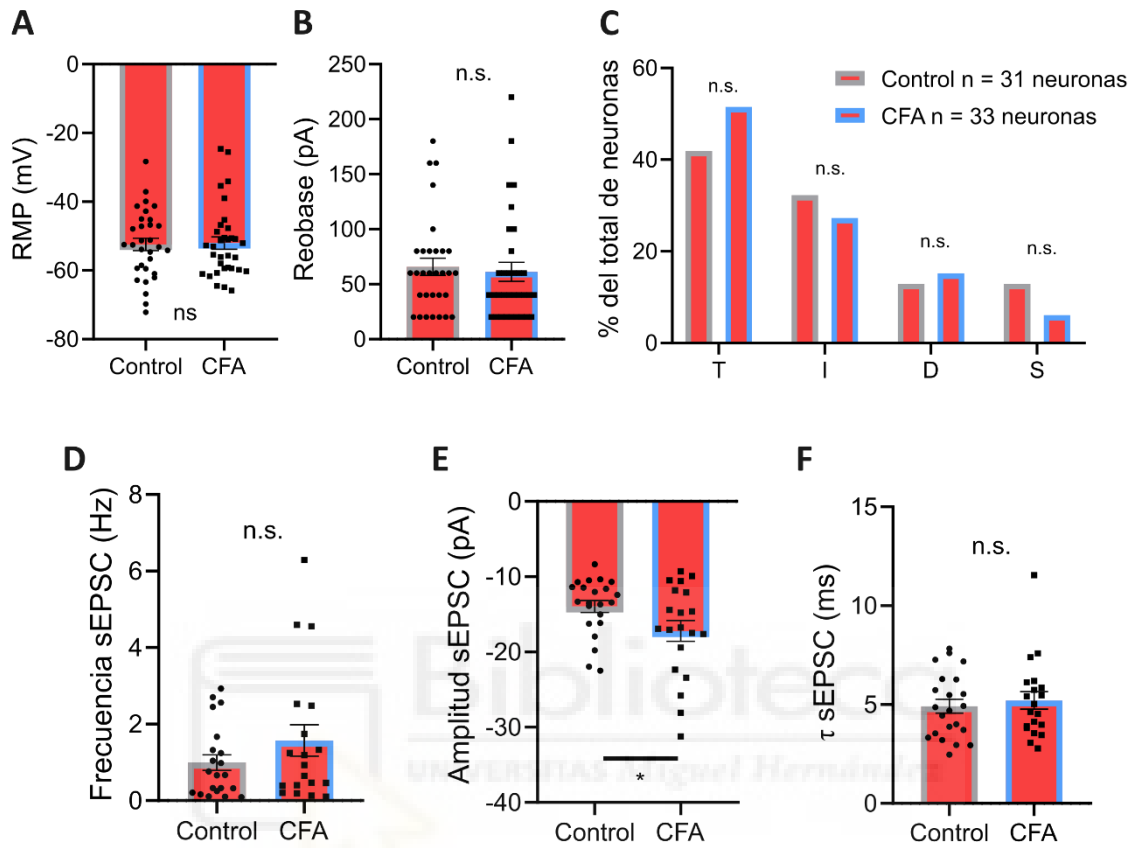


FIGURA 39. Caracterización de las propiedades biofísicas de las neuronas sensibles a calor nocivo tdTomato⁺ en condiciones control e inflamatorias. (A, B): Potencial de membrana en reposo (RMP, A) y corriente rebase (B) para las neuronas tdTomato⁺ en ambos grupos experimentales, control y CFA. Se representa la media, las barras de error representan la SEM y cada punto representa una célula (n.s. = diferencias no significativas, test de Mann-Whitney). (C): Comparación entre los patrones de disparo de las neuronas tdTomato⁺ en los grupos control y CFA (n.s. = diferencias no significativas, test exacto de Fisher). (D, E, F): Comparación de la frecuencia con la que se observan corrientes excitatorias postsinápticas (D), amplitud media (E) y constante de inactivación (τ , F) de las mismas en neuronas tdTomato⁺ en condiciones control y de inflamación. Se representa la media, las barras de error representan la SEM y cada punto representa una neurona. En el caso de la amplitud y la τ , cada punto representa la media de todas las amplitudes y de todas las τ respectivamente para una única neurona (* = $p < 0.05$, n.s. = diferencias no significativas, test de Mann-Whitney). $n = 6$ ratones por grupo experimental.





5. DISCUSIÓN



El dolor constituye un mecanismo de protección esencial para la supervivencia, permitiendo la detección temprana de estímulos nocivos y minimizando el contacto con agentes potencialmente dañinos. Ante un daño tisular, se activa una sensibilización de las respuestas nociceptivas, lo que contribuye a evitar el uso o contacto con el área lesionada. Sin embargo, esta potenciación de la sensibilidad puede volverse crónica e incapacitante, lo que en muchos casos requiere intervención terapéutica para su manejo (Woolf 2010). En esta tesis se ha explorado la naturaleza de las neuronas sensoriales que expresan el canal nociceptivo TRPA1, que están involucradas en el desarrollo de esta potenciación, y se ha caracterizado un modelo de ratón transgénico que permite la identificación y manipulación de esta población neuronal. Finalmente, se han explorado los circuitos espinales que participan en la transmisión del dolor y la transición del dolor agudo al crónico.

5.1. Las fibras TRPA1⁺ inervan tanto la piel como los órganos internos

En primer lugar, se estudiaron las proyecciones de las terminaciones periféricas de neuronas sensoriales hacia diferentes dianas. El caso de la superficie plantar cobraba especial relevancia, puesto que para el estudio de la inflamación son comunes los modelos animales en los que se induce una inflamación local mediante la administración de sustancias inflamatorias en estos tejidos (Morris 2003; McCarson y Fehrenbacher 2021). Para el estudio de los terminales que inervan la superficie plantar se inyectó un trazador retrógrado por vía intraplantar y se cuantificaron las neuronas de los ganglios raquídeos que habían incorporado el marcador. En estudios similares hechos con el trazador True Blue, se ha comprobado que las neuronas marcadas aparecen fundamentalmente en los ganglios L3, L4, y L5, con una menor participación de L6 (Rigaud et al. 2008; Pogatzki-Zahn et al. 2021). Es por ello que llevamos a cabo la cuantificación en estos DRG lumbares. Respecto al trazador, utilizamos la aglutinina de germen de trigo unida a un fluoróforo (WGA Alexa Fluor 594). Este trazador es incorporado principalmente por fibras no mielínicas, entre las que se encuentran las fibras C que expresan TRPA1 (Valtschanoff, Weinberg, y Rustioni 1992; Story et al. 2003). En nuestro caso, encontramos que entre un 16 y un 20 % (en función de si el conteo se lleva a cabo en cultivos de neuronas dissociadas o en rodajas de tejido respectivamente) de las neuronas de DRG lumbares se marcan con el trazador, es decir, inervan la superficie plantar. Este resultado es similar a los observados en estudios previos de trazado de terminales cutáneas. Pogatzki-Zahn y

colaboradores reportan una media del 18 % de neuronas marcadas con True Blue en los ganglios lumbares, aunque con distribución desigual entre los diferentes ganglios, alcanzando un 30.6 % en L4 (Pogatzki-Zahn et al. 2021). Otros trabajos que utilizan RetroBeads como trazador describen un porcentaje más bajo, en torno al 6 %, pero coinciden en señalar la mayor participación de L3 y L4 en la inervación de esta región (da Silva Serra et al. 2016). La diferencia en cuanto al porcentaje detectado de neuronas que inervan la superficie plantar puede atribuirse, entre otros factores, a las características del marcador utilizado. Algunas de estas características son el área de difusión del trazador en la zona de inyección, especialmente reducida en el caso de las RetroBeads (Katz, Burkhalter, y Dreyer 1984), la captación selectiva del trazador por parte de poblaciones neuronales específicas, como en el caso del WGA por fibras no mielínicas (Valtschanoff et al. 1992), el filtrado del trazador desde el axón hasta el espacio extracelular, descrito en el caso del True Blue (Weidner, Miceli, y Repe´rant 1983), o la sensibilidad del fluoróforo al fotoblanqueo (Clancy y Cauller 1998) entre otros.

¿Cuál es la identidad molecular de estos terminales? ¿Está presente el canal TRPA1 en las neuronas sensoriales cutáneas? Los experimentos funcionales indican que el 50 % de las fibras que inervan la superficie plantar son sensibles a AITC, es decir, expresan TRPA1, siendo este porcentaje superior al encontrado en neuronas sensoriales del DRG lumbar que inervan otros tejidos (38 %). El porcentaje de neuronas sensoriales que expresan un determinado canal iónico varía ampliamente en la bibliografía, al utilizarse diferentes métodos en distintos modelos animales. Los trabajos iniciales identificaron que un 3.6 % de las neuronas del DRG de ratón son positivas para la señal de ARNm de TRPA1 (Story et al. 2003), porcentaje que no ha dejado de aumentar conforme mejoran las técnicas de identificación. En ratones, Nagata y colaboradores, mediante la misma técnica, colocan este porcentaje en un 56.5 % (Nagata et al. 2005), y Caspani y colaboradores lo sitúan en un 28 % restringiéndose a los ganglios lumbares (Caspani et al. 2009), mientras que mediante la técnica de inmunohistoquímica encuentran un 22 % de neuronas de DRG de rata positivas para TRPA1 (Bautista et al. 2005). Para hacer la comparación pertinente, se consideran los trabajos en los que se llevan a cabo experimentos funcionales, en los que la aplicación de diferentes agonistas de TRPA1 permiten establecer el porcentaje de neuronas de DRG que contienen copias funcionales del canal. Estos porcentajes varían enormemente, encontrándose entre el 20 y el 60 % en la mayoría de los casos (Malin et al. 2011; Barabas, Kossyrev, y Stucky 2012; Barabas y Stucky 2013; Zappia et al. 2017; Han et al. 2018; Patil et al. 2023). Atendiendo específicamente a los terminales cutáneos, los porcentajes de neuronas sensibles a los agonistas de TRPA1 oscilan entre el 35 y el 60 % (Barabas y Stucky 2013; da Silva Serra et al. 2016), porcentajes no muy diferentes a los encontrados en el resto de

neuronas no cutáneas. Sin embargo, en esta tesis se describe por primera vez un enriquecimiento de terminales TRPA1⁺ en la porción de neuronas sensoriales de DRG lumbares que inervan la superficie plantar con respecto a las neuronas sensoriales no cutáneas. Respecto al canal TRPM8, el porcentaje de neuronas que responden a sus agonistas ronda el 2 %, coincidente con lo encontrado en la literatura (Jankowski, Rau, y Koerber 2017; Yajima et al. 2022), mientras que el porcentaje de neuronas que expresan TRPV1 ronda el 25 %, en el límite inferior de los porcentajes descritos en la literatura (27 - 60 %) (Malin et al. 2011; da Silva Serra et al. 2016; Kim et al. 2016; Zappia et al. 2017). Es posible que, dado que en los experimentos de imagen de calcio la capsaicina es el estímulo que se aplica en último lugar, algunas de las neuronas hayan sufrido daño o desensibilización como consecuencia de estímulos previos. Es posible también que el nivel de calcio de las neuronas antes de la aplicación de capsaicina fuera demasiado alto a causa de los estímulos anteriores, lo que podría haber enmascarado la respuesta a este agonista.

El papel de detector de estrés celular y daño tisular de TRPA1 no se limita a la superficie corporal (Viana 2016). De hecho, entre las neuronas sensoriales que conforman el nervio vago e inervan las vísceras, TRPA1 juega un papel principal en la detección de frío, siendo especialmente abundante en las neuronas que inervan las vías aéreas (Gers-Barlag et al. 2021). En los experimentos descritos en esta tesis, estudiamos otros tejidos, y observamos que sólo un 2.6 % de las neuronas en cultivo de los ganglios vagales estaban marcadas con el trazador, lo que las señala como aferentes estomacales. Es lógico encontrar un porcentaje bajo de neuronas marcadas, ya que forman parte de un ganglio que inerva muchos órganos diferentes, mientras que para la cuantificación de las neuronas que inervan la superficie plantar nos limitamos a los ganglios de la región lumbar. En trabajos previos se describe un porcentaje similar (< 5 %) (Brierley et al. 2009), aunque otros apuntan hasta un 20 % de neuronas vagales que inervan el estómago (Zhang et al. 2004). Este porcentaje, además, es altamente variable entre especies. Por ejemplo, inyecciones de trazadores retrógrados en la pared estomacal de ratas muestran que entre un 20 y un 30 % de las neuronas del ganglio nodoso inervan el estómago (Patterson et al. 2003; Schicho et al. 2004), y el mismo experimento en hurones arroja un resultado del 12 - 14 % (Young, Cooper, y Blackshaw 2008). Cabe destacar que el estómago no recibe sólo inervación sensorial de terminales vagales, sino que neuronas sensoriales que tienen su soma en DRG torácicos, también inervan la porción superior del tracto gastrointestinal (Spencer et al. 2016).

Los experimentos funcionales en neuronas del VG usando la técnica de imagen de calcio nos permitieron explorar la expresión de diferentes canales TRPs. No se observaron diferencias

significativas en el número de neuronas sensibles a AITC entre la población de neuronas estomacales y el resto de aferentes vagales (22 vs 33 % respectivamente). Otros trabajos describen porcentajes similares de respuestas a AITC entre las neuronas sensoriales vagales (Nagata et al. 2005; Fajardo et al. 2008; Nassenstein et al. 2008; Hondoh et al. 2010; Patil et al. 2023), y algunos sí que apuntan a una mayor expresión de TRPA1 por parte de los aferentes estomacales, encontrándose en un 55 – 70 % de ellos (Brierley et al. 2009; Kondo et al. 2009). Aun así, cabe indicar que estos estudios utilizan técnicas de *in situ* e inmunohistoquímicas, que, si bien revelan la presencia de ARNm o la proteína de TRPA1, no confirman la existencia de canales funcionales. Parece que TRPA1 en esta víscera juega un papel importante en procesos gastrointestinales dolorosos producidos por la distensión estomacal, y su rol en la motilidad gástrica está aún sujeto a debate (Kondo et al. 2009; Mitrovic et al. 2010; Poole et al. 2011).

Lo que sí observamos es una mayor proporción de células que respondían a capsaicina, el agonista de TRPV1, entre las neuronas del ganglio vagal que inervan el estómago respecto al resto de neuronas del ganglio. Más del 50 % de las neuronas sensoriales que inervan esta víscera se activaron en respuesta a capsaicina, por el 36 % del resto de las neuronas del ganglio. Estos porcentajes concuerdan con los observados en experimentos similares realizados en rata, en los que se observa entre un 40 y un 80 % de neuronas gástricas del ganglio vagal positivas para TRPV1 (Patterson et al. 2003; Schicho et al. 2004). La abundancia de canales TRPV1 en los aferentes gástricos parece indicar un papel importante de este canal polimodal en el estómago. Estudios previos han demostrado la sensibilidad a protones del canal en neuronas sensoriales del ganglio nodoso, lo que sugiere un papel en la detección de la acidez estomacal (Sugiura et al. 2005). Además, TRPV1 modula la mecanosensibilidad de terminales vagales estomacales, pudiendo intervenir en la sensación de saciedad (Kentish et al. 2015).

5.2. El ratón TRPA1-ChR2-EYFP como herramienta para el estudio de la población de neuronas sensoriales TRPA1⁺

El ratón TRPA1-Cre, generosamente donado por el Dr. Mark Hoon, se ha utilizado en esta tesis para estudiar las neuronas que expresan el canal TRPA1, permitiendo su identificación y posterior manipulación mediante la canalrodopsina2 (ChR2). Además, el cruce de este ratón

transgénico con una línea reportera fluorescente ha permitido la visualización de las neuronas y sus proyecciones centrales.

5.2.1. La recombinación en el ratón TRPA1-Cre presenta baja eficiencia, pero alta selectividad

Para estimar la eficiencia de una línea Cre, es habitual el uso de anticuerpos para el marcaje de la proteína de interés y la comparación de la tinción obtenida con la distribución del marcador fluorescente dependiente de Cre. Sin embargo, el rendimiento de los anticuerpos para los canales TRP es, por lo general, subóptimo (Voskuil 2014; Virk et al. 2019; Hernández-Ortego et al. 2022). Es por ello que, para evaluar el rendimiento de la recombinación en el ratón TRPA1-ChR2-EYFP, llevamos a cabo experimentos funcionales de imagen de calcio en cultivos de DRG. Observamos que la práctica totalidad de las neuronas que expresaban el reportero fluorescente ChR2-EYFP (95.9 %) respondían al agonista de TRPA1, AITC. También existía una elevada proporción de neuronas ChR2-EYFP⁺ sensibles al agonista (42.7 %). Estos datos nos indican, por un lado, que la recombinación en nuestro ratón no está siendo completa, es decir, no en todas las células que expresan TRPA1 se está expresando el reportero. Esto puede deberse a varias razones, una de las cuales puede ser el nivel de expresión del promotor que controla la Cre. En un sistema Cre-loxP, la frecuencia de recombinación es proporcional a la actividad del promotor (Araki et al. 1997). Es posible, por tanto, que sólo en las neuronas en las que hay un nivel más alto de expresión de TRPA1 sea donde también se alcance un nivel mínimo de recombinasa para que se produzca la recombinación. En nuestro caso, 47 de 207 células que responden a AITC son ChR2-EYFP⁺, lo que corresponde a una eficiencia de recombinación del 22.7 %. Por otro lado, son muy pocas las células (2/49) en las que la recombinación ha ocurrido, a priori, en ausencia de TRPA1 funcional. Esto abre tres posibilidades: que estas neuronas sí expresen la proteína TRPA1 pero que ésta no llegue a ser funcional, que durante el desarrollo haya existido en algún momento expresión de TRPA1 que permitió expresión de la Cre y por tanto del reportero pero posteriormente TRPA1 se haya silenciado, o que la Cre se haya expresado de manera inespecífica ("leaky"). En cualquier caso, no supone un problema para nuestro estudio, y aunque no consigamos marcar toda la población TRPA1⁺, podemos considerar con una alta probabilidad que una neurona ChR2-EYFP⁺ va a ser TRPA1⁺.

Otros estudios recientes han utilizado abordajes similares para marcar las neuronas TRPA1⁺. Patil y colaboradores generaron un ratón TRPA1^{Flp}, que expresaba la recombinasa FLP_o en células

TRPA1⁺, y lo cruzaron con un ratón reportero cuya expresión de tdTomato depende de FLP. En este ratón, el 83.3 % de las neuronas de DRG torácicos que expresan tdTomato responden a agonistas de TRPA1, pero estas neuronas tdTomato⁺ constituyen sólo un 15.3 % de todas las que responden a estos agonistas (Patil et al. 2023), números similares a los que obtenemos con el ratón TRPA1-Cre. De hecho, un estudio en ratones reporteros de la hormona liberadora de corticotropina demuestra que la eficiencia de recombinación con FLP es menor que la conseguida con Cre (Zhao et al. 2023). Otra alternativa a la generación de ratones transgénicos para conseguir la expresión de Cre es la inyección de vectores virales que incorporen ese constructo (Joshi, Labhasetwar, y Ghorpade 2017). La eficiencia de esta técnica, si bien depende de varios factores como el serotipo del virus, la vía de administración o la edad del animal, ha sido ampliamente demostrada para la expresión de genes en neuronas sensoriales del DRG (Xu et al. 2003; Mason et al. 2010; Abdallah et al. 2018). Además, permite superar algunos problemas que presenta la generación de ratones transgénicos, como la necesidad de establecer cruces de ratones sucesivos para obtener el genotipo deseado, o la expresión del reportero en tejidos que sólo expresaron la Cre de manera transitoria durante el desarrollo, pero quedaron marcados al ocurrir la recombinación.

5.2.2. La activación de los canales activados con luz no pudo observarse mediante técnicas de imagen de calcio pero sí mediante técnicas electrofisiológicas.

Para comprobar que la ChR2 introducida es funcional y responde a iluminación, se aplicaron pulsos de luz a las neuronas del DRG en cultivo y se midieron variaciones de la concentración de calcio intracelular. Sorprendentemente, ninguna de las frecuencias de estimulación fue capaz de inducir aumentos de calcio intracelular. Esto puede deberse a una limitación metodológica. Utilizamos como indicador de calcio el Fura 2 que, al tratarse de un sistema ratiométrico, requiere de la adquisición de dos imágenes a diferentes longitudes de onda. El sistema para la selección de longitudes de onda se basa en una rueda de filtros controlada mediante un cambiador programable. Este mecanismo requiere tiempos específicos de conmutación, lo que limita la frecuencia de muestreo. Según lo descrito en la literatura, la transición del estado cerrado al abierto y de nuevo al cerrado para la ChR2 es sumamente rápida, de pocas decenas de milisegundos (Nagel et al. 2003; Erofeev et al. 2019). La apertura de las canalrodopsinas generalmente solo da lugar a pequeñas corrientes de calcio a concentraciones fisiológicas, y los

aumentos citoplasmáticos de calcio resultan de la activación de canales dependientes de voltaje durante la despolarización asociada al potencial de acción (Yizhar et al. 2011). Aun así, estos incrementos de calcio son transitorios y se prolongan por tiempos inferiores al segundo (Rickgauer, Deisseroth, y Tank 2014; Packer et al. 2015), siendo difíciles de capturar con tasas de muestreo bajas como la que utilizamos. Además, aunque el espectro de absorción del Fura2 no solape con el de la ChR2, el de emisión sí que lo hace, dificultando la estimulación y adquisición simultáneas. Es por ello que actualmente la mayoría de los trabajos busca combinar opsinas e indicadores de calcio excitables en espectros bien diferenciados (Packer et al. 2015; Renault et al. 2015).

No ocurrió lo mismo cuando se llevaron a cabo experimentos de electrofisiología en la configuración de célula adherida. En la configuración de fijación de voltaje, la aplicación de pulsos de luz de 10 ms con una frecuencia de 10 Hz indujo corrientes de acción, aunque no todos los pulsos fueron capaces de provocar una respuesta. Aunque se ha comprobado que, para la ChR2, las frecuencias de estimulación entre 1 y 10 Hz son las más adecuadas para evocar corrientes de manera consistente (Boyden et al. 2005; Zhang y Oertner 2007), algunos trabajos más recientes limitan las frecuencias óptimas a 5 Hz (Erofeev et al. 2019), pudiéndonos encontrar por encima del límite óptimo. Respecto a la duración de los pulsos, se describen también tiempos idóneos de entre 1 y 30 milisegundos para la generación de corrientes de acción (Boyden et al. 2005; Erofeev et al. 2019). A medida que aumentábamos la intensidad de la luz, también aumentaba la proporción de pulsos que eran capaces de evocar corrientes de acción. Esto también concuerda con la bibliografía, que describe que la amplitud de la corriente evocada es proporcional a la intensidad de la luz (Ishizuka et al. 2006). En conclusión, aunque las condiciones de estimulación para evocar potenciales de acción en estas neuronas deben ser optimizadas, demostramos que la aplicación de luz azul pulsante es capaz de evocar potenciales de acción en las neuronas sensoriales del DRG que expresan ChR2-EYFP, y que éstas son, en su práctica totalidad, TRPA1⁺.

5.2.3. La aplicación de pulsos de luz *in vivo* evoca en los ratones comportamientos similares a los provocados por la activación con agonistas de TRPA1

Una vez que comprobamos que la activación por luz de las neuronas TRPA1⁺ *in vitro* era posible y selectiva, el siguiente objetivo fue lograr su activación *in vivo*. Esto confirmaría que el

ratón TRPA1-ChR2-EYFP es una herramienta útil para el estudio de estas fibras y de los circuitos que establecen en el asta dorsal de la médula espinal. Estudios anteriores ya emplearon la ChR2 como herramienta para el estudio de subpoblaciones de neuronas sensoriales, tanto de mecanorreceptores que señalizan para el tacto placentero (Elias et al. 2023), como de nociceptores, entre los que se encuentran las neuronas que expresan $\text{Na}_v1.8$, TRPV1 o Mrgprd (Daou et al. 2013; Stemkowski et al. 2016; Beaudry et al. 2017; Cohen et al. 2019). Esto se consigue generando ratones transgénicos que expresan el canal sensible a luz, normalmente unido a un reportero fluorescente, bajo promotores específicos de estas subpoblaciones. En el caso de los $\text{Na}_v1.8/\text{TRPV1}/\text{Mrgprd} - \text{ChR2}$, la frecuencia de aparición y la duración de los comportamientos nocifensivos tras la iluminación estaba directamente relacionado con la intensidad de la luz utilizada, mientras que la frecuencia de los pulsos de luz (normalmente 2, 5 o 10 Hz) no influía en estos comportamientos. En el ratón TRPA1-ChR2-EYFP observamos algo similar: la frecuencia de los pulsos de luz no es relevante para inducir comportamientos de retirada, retracción o lamida, pero sí la intensidad de la luz, especialmente para el comportamiento de lamida. Esto puede explicarse según lo observado en los experimentos de electrofisiología, en los que una mayor potencia de luz generaba potenciales de acción de manera más eficaz.

Es importante destacar aquí que los dos componentes del dolor, el reflejo o “sensorial” y el afectivo, se asocian con comportamientos diferentes. Mientras que la retirada de la pata se considera un comportamiento reflejo, la lamida, retracción sostenida, saltos o huidas forman parte de los comportamientos afectivos, que involucran circuitos límbicos y corticales y que motivan una acción consciente que haga cesar el dolor (Price 2000; Corder et al. 2017, 2019). La activación optogenética de las terminales $\text{Na}_v1.8$ da lugar a respuestas robustas de retirada, lamida, saltos y vocalizaciones, debido a su amplia expresión por parte de la mayoría de los nociceptores (Shields et al. 2012; Daou et al. 2013). Cuando la expresión se restringe a subpoblaciones concretas de nociceptores (peptidérgicos y no peptidérgicos, identificados en estos experimentos por la expresión de TRPV1 y MrgprD respectivamente), los comportamientos son ligeramente diferentes. Aunque la retirada es un comportamiento común en la activación de ambos tipos de nociceptores, la activación de terminales TRPV1⁺ genera comportamientos de lamida mucho más marcados, mientras que la de terminales MrgprD⁺, aunque produce retirada de la pata, en pocas ocasiones evoca lamida o aversión al contexto en una jaula iluminada continuamente con luz azul (Beaudry et al. 2017; Warwick et al. 2021; L.-B. Wang et al. 2022). Esto sugiere que estos últimos, presumiblemente mecanonociceptores (Cavanaugh et al. 2009), aunque señalizan sensaciones de dolor que evocan un reflejo de

retirada, no parece que transmitan el componente emocional del dolor en condiciones fisiológicas. En cambio, en modelos de neuropatía, su activación sí que induce comportamientos afectivos debido a modificaciones en circuitos de médula espinal que conceden a esta población acceso a vías ascendentes de señalización de dolor (Warwick et al. 2021; L.-B. Wang et al. 2022).

Los comportamientos que se observan en el ratón TRPA1-ChR2-EYFP tras la activación optogenética de TRPA1 son los mismos que se describen tras la administración intraplantar de agonistas de TRPA1, tanto AITC como formalina (McNamara et al. 2007; Raisinghani et al. 2011; Hiyama et al. 2018), con especial hincapié en la lamida de la pata afectada. Teniendo en cuenta esta profusión de comportamientos de lamida, similares a los que se han descrito tras estimular la subpoblación de nociceptores peptidérgicos TRPV1⁺ (Beaudry et al. 2017; Warwick et al. 2021; L.-B. Wang et al. 2022), podría sugerirse una posible pertenencia de estas fibras a la población de nociceptores peptidérgicos, hipótesis que se comprobó a continuación.

5.2.4. Las neuronas TRPA1⁺ marcadas en el ratón TRPA1-ChR2-EYFP pertenecen mayoritariamente a la subpoblación de nociceptores no peptidérgicos

En los trabajos clásicos, se han reportado porcentajes variables de neuronas TRPA1⁺ en los DRG. Sin embargo, originalmente se las ha considerado como una subpoblación dentro del gran grupo de nociceptores TRPV1⁺, expresando CGRP y SP y por lo tanto, clasificándolas como terminales peptidérgicos (Story et al. 2003; Bautista et al. 2005; Nagata et al. 2005; Trevisani et al. 2007). Sin embargo, este paradigma ha cambiado en los últimos años. Caspani y colaboradores ya sugirieron que sólo una pequeña parte de las neuronas TRPA1⁺ de DRG de ratón coexpresa CGRP, y observaron su expresión predominantemente en terminales no peptidérgicos IB4⁺ (Caspani et al. 2009). Barabas y colaboradores confirmaron estos resultados, ampliando sus observaciones a ratas (Barabas et al. 2012), mientras que otros estudios en fibras corneales y del colon también encontraron baja coexpresión de TRPA1 y TRPV1/CGRP (Kim et al. 2010; Malin et al. 2011; Schecterson et al. 2020). Finalmente, la clasificación por secuenciación de mRNA de célula única de las neuronas somatosensoriales de ratón ha permitido establecer varios “clusters” o grupos moleculares. Usoskin y colaboradores establecen 11 “clusters”, de los cuales tres corresponden a nociceptores no peptidérgicos, y dos, a nociceptores peptidérgicos. Curiosamente, según este trabajo, TRPA1 se expresa en los tres grupos no peptidérgicos (Usoskin et al. 2015). Otros trabajos más recientes aumentan este número de “clusters”

neuronales hasta los 17 (Qi et al. 2024) o 18 (Bhuiyan et al. 2024), y encuentran que TRPA1 se expresa especialmente en las poblaciones MRGPRD⁺ y MRGPRB4⁺ (Qi et al. 2024).

Los resultados obtenidos en esta tesis apuntan en la misma dirección. Sólo un 17.9 % de las neuronas marcadas con EYFP expresaban también CGRP, mientras que un 84.9 % unían la isolectina IB4. Esto nos lleva a concluir que la mayoría de las neuronas TRPA1⁺/Chr2-EYFP⁺ pertenecen al grupo de nociceptores no peptidérgicos. Este resultado contrasta con lo encontrado en trabajos similares recientes. Patil y colaboradores emplean un ratón TRPA1^{FLP}R26^{ai65f}, en el que se induce la recombinación mediada por la recombinasa FLPO en las células que expresan TRPA1. La recombinación permite la expresión del reportero tdTomato en estas células. En ese trabajo, CGRP se expresa en un 80% de las neuronas sensoriales tdTomato⁺ del DRG, indicando la pertenencia de las neuronas TRPA1⁺ al grupo de los nociceptores peptidérgicos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en este estudio, sólo un 15.3 % de las neuronas de DRG que responden a AITC en cultivo expresan tdTomato, por lo que se está marcando un pequeño grupo de todas las neuronas TRPA1⁺ (Patil et al. 2023). Algo similar ocurre en nuestro modelo, en el que sólo un 22.7 % de toda la población que responde a AITC expresa EYFP-ChR2. Estos datos sugieren que las neuronas TRPA1⁺ son molecularmente heterogéneas y no forman una población única. Es posible que las diferentes herramientas que se utilizan para marcar estas células tengan una eficiencia diferente en las distintas subpoblaciones.

5.2.5. Los terminales centrales de las neuronas sensoriales TRPA1⁺ se proyectan a las láminas superficiales del asta dorsal de la médula espinal, y su activación induce expresión de cFos en neuronas de segundo orden

La entrada de las fibras sensoriales en el asta dorsal de la médula espinal desde la periferia está organizada de forma precisa (Basbaum et al. 2009). Por normal general, los nociceptores peptidérgicos alcanzan las láminas I y II externa mientras que los no peptidérgicos llegan a lámina II interna (Snider y McMahon 1998). Esta distribución permite estratificar la información sensorial y procesarla gracias a la heterogeneidad de poblaciones de interneuronas, neuronas de proyección y neuronas motoras que la reciben (Todd 2010; Koch, Acton, y Goulding 2018). La presencia de poblaciones concretas permite delimitar las diferentes láminas, como es el caso de las neuronas de proyección NK1R⁺ para lámina I (Cameron et al. 2015) o el de las interneuronas PKCγ⁺. Estas últimas se sitúan mayoritariamente en la lámina II interna en su porción más

ventral, por lo que se han utilizado en multitud de trabajos para delimitar lo que se consideran las láminas superficiales de la médula espinal (Polgár et al. 1999; Peirs et al. 2014). Además, la mayoría de entradas sinápticas que reciben procede de aferentes mielínicos, y parece que esta población participa en el desarrollo de la alodinia mecánica mediante la conexión de las vías inocuas con los circuitos del dolor (Artola, Voisin, y Dallel 2020). Es por ello que utilizamos un marcaje con un anticuerpo anti-PKCy para identificar los niveles medulares a los que proyectan las fibras TRPA1⁺ del ratón TRPA1-ChR2-EYFP. Como nuestro marcaje EYFP se localiza en la membrana celular, en la inmunohistoquímica se observa un haz de fibras penetrando en el asta dorsal (Fig. 25), pero el tipo de marcaje empleado no permite distinguir las terminaciones sinápticas. Lo que sí se distingue claramente es que los terminales EYFP⁺ se detienen antes de llegar a la capa de neuronas PKCy⁺, de la misma manera que los nociceptores no peptidérgicos IB4⁺/MrgprD⁺ también acaban inmediatamente dorsales a esta población de interneuronas (Zylka et al. 2005). Esto apoya los resultados en los que se observaba un alto porcentaje de neuronas EYFP⁺ marcadas con IB4, confirmando a la mayoría de neuronas TRPA1⁺ como nociceptores no peptidérgicos. No obstante, aunque muchas de ellas alcancen la capa más profunda de las láminas superficiales, no podemos descartar que otras terminen también en las láminas I y II.

Quisimos comprobar si la activación optogenética de esta subpoblación de neuronas sensoriales era capaz de producir expresión de cFos en el asta dorsal de la médula espinal, lo que daría información sobre los circuitos establecidos por estas fibras. Hace ya décadas que se describió la expresión de este protooncogén en láminas superficiales tras la aplicación de estímulos nocivos de diferentes modalidades en la pata trasera. Más concretamente, la inyección intraplantar de agonistas de TRPA1 produce un aumento de la expresión de cFos en esta región (Hunt et al. 1987; Todd et al. 2002; Li et al. 2004). Algunos estudios han hilado más fino, reportando expresión de cFos en láminas superficiales tras activar, con técnicas optogenéticas, poblaciones específicas de nociceptores Na_v1.8⁺ (Daou et al. 2013). Otros han demostrado que la activación con luz de fibras mielínicas Aβ no induce expresión de cFos en las láminas superficiales en condiciones fisiológicas, pero sí en situaciones de hipersensibilidad inducida por neuropatía (Tashima et al. 2018). En esta tesis demostramos que la activación por luz de nociceptores TRPA1⁺ induce la expresión de cFos en las láminas superficiales del asta dorsal. Por limitaciones en la disponibilidad de anticuerpos o de vías de iluminación para la excitación simultánea, no se pudieron combinar marcajes específicos de láminas (PKCy o IB4) con el marcaje cFos y el de las fibras EYFP⁺, por lo que la división entre las láminas I y II tuvo que hacerse en base a criterios histológicos y no se diferenció entre la lámina II externa e interna. A

pesar de ello, sí se observa un mayor marcaje de cFos en la lámina II en el lado estimulado comparado con el no estimulado, confirmando que los terminales TRPA1⁺ sinaptan en neuronas espinales situadas en esa lamina. Experimentos de electrofisiología han demostrado que la activación de fibras no peptidérgicas MrgprD⁺ evoca corrientes excitatorias en interneuronas de la lámina II (Wang y Zylka 2009), lo que, considerando las neuronas TRPA1⁺ como nociceptores no peptidérgicos, coincide con nuestros resultados.

El número de neuronas cFos⁺ que observamos en la lámina I, no es significativamente mayor en el lado estimulado, lo que sugiere que el número de sinapsis de las fibras TRPA1 en esa lámina sería bajo o inexistente. Esto es consistente con los estudios previos, que muestran que, en condiciones fisiológicas, las fibras no peptidérgicas forman escasas sinapsis con neuronas de proyección de lámina I, enviando la mayor parte de la información a centros superiores a través de neuronas ascendentes de láminas más profundas (III-V) con las que contactan gracias a circuitos polisinápticos que comienzan en lámina III (Zylka et al. 2005; Warwick et al. 2021; L.-B. Wang et al. 2022).

No obstante, estos resultados son difíciles de conciliar con las observaciones de comportamiento. Si las neuronas sensoriales TRPA1⁺ marcadas en nuestro modelo son nociceptores no peptidérgicos y, por tanto, no involucran a las neuronas de proyección de la lámina I en condiciones fisiológicas, ¿por qué su activación optogenética evoca profusos comportamientos de lamida con un componente afectivo propio de la activación de fibras peptidérgicas? Para contestar a esta pregunta, se deben tener en cuenta algunas consideraciones, además de ciertas limitaciones de nuestro modelo. En primer lugar, se ha descrito que las fibras no peptidérgicas envían información ascendente a través de neuronas de proyección de láminas V, conocidas como de amplio rango dinámico (“wide dynamic range” o WDR) por señalar tanto información inocua como nociva (Wercberger y Basbaum 2019). La activación de las fibras MrgprD⁺ no logra evocar respuestas con un componente afectivo ni producir aversión (Warwick et al. 2021; L.-B. Wang et al. 2022), lo que sugiere que están señalizando una sensación no “aversiva” a través de estas WDR. Sin embargo, aunque en esta tesis se identifica a las fibras TRPA1⁺ como no peptidérgicas, esto se hace a través del marcaje con IB4 y no con MrgprD. Aunque todas las neuronas MrgprD⁺ son IB4⁺, alrededor del 76 % de las IB4⁺ son MrgprD⁺ (Zylka et al. 2003, 2005), existiendo un porcentaje de nociceptores no peptidérgicos que no expresa MrgprD. A su vez, aunque se ha descrito que más del 90 % de las MrgprD⁺ son también TRPA1⁺, sólo alrededor del 35 % de las TRPA1⁺ son MrgprD⁺ (Wang et al. 2019). Teniendo en cuenta que en nuestro ratón sólo se marca con el reportero ChR2-EYFP un pequeño porcentaje de las TRPA1⁺ (alrededor del 27 %), cabe la posibilidad de que esta

población marcada forme parte de las neuronas IB4⁺/MrgprD⁻. Estas fibras se proyectarían hacia la lámina II interna, donde a través de conexiones polisinápticas transmitirían información nociceptiva a neuronas de proyección, no pertenecientes a la lámina I, sino a neuronas WDR de la lámina V. Esta información sería capaz de evocar comportamientos conscientes de evitación del dolor.

Esta categorización de las fibras TRPA1⁺ como nociceptores no peptidérgicos conduce a la pregunta sobre su papel en el desarrollo de la hipersensibilidad en condiciones inflamatorias. Se ha considerado que TRPA1 juega un rol importante en la inflamación, actuando como un “centinela durmiente” que se activa ante sustancias indicadoras de daño tisular (Viana 2016) y cuyo papel es fundamental en el desarrollo de la hiperalgesia en estas condiciones (Bautista et al. 2013). Por otro lado, la inflamación aumenta la sensibilidad a capsaicina, el agonista de TRPV1, específicamente en los terminales no peptidérgicos (Dirajlal et al. 2003; Breese et al. 2005). De hecho, la eliminación de los nociceptores no peptidérgicos da lugar a una disminución tanto de la expresión de TRPV1 en condiciones inflamatorias como de la hiperalgesia asociada (Pinto et al. 2019). Por lo tanto, es posible que la subpoblación de nociceptores no peptidérgicos TRPA1⁺ actúe como sensora de inflamación y su activación provoque la expresión o activación de TRPV1 específicamente en esos mismos terminales para que funcionen como detectores de daño en condiciones inflamatorias.

Cabe preguntarse si estos datos recogidos sobre la naturaleza de las neuronas TRPA1⁺ son extrapolables a toda la población, teniendo en cuenta que la muestra estudiada conforma un 23 % de toda la población funcional. Desconocemos los factores determinantes para que ocurra la recombinación en unas células y no en otras, y por lo tanto no podemos considerar este 23 % como una muestra aleatoria de la población general. Sin embargo, constituye un porcentaje importante, y su activación es suficiente para desencadenar comportamientos nocifensivos, lo que remarca su relevancia. Futuros estudios deberán ahondar en el estudio de esta población de nociceptores y los circuitos específicos que forma en médula espinal y que facilitan la transmisión de información nociceptiva y la sensibilización en situaciones de inflamación.

5.3. El modelo del CFA como paradigma de la inflamación

La condición inflamatoria puede provocar la sensibilización periférica, en la que canales como el TRPA1 juegan un papel fundamental (Bautista et al. 2013). Además, puede provocar la sensibilización central, que afecta al procesamiento del dolor a nivel del sistema nervioso central (Woolf 2011). En esta tesis se han explorado algunos de estos mecanismos, poniendo especial interés en identificar los circuitos implicados en la transmisión de dolor térmico en condiciones fisiológicas e inflamatorias. Empleamos el modelo del CFA ampliamente utilizado en la literatura. Este modelo nos resultaba interesante por varias razones. En primer lugar, la preparación de la solución y su inyección intraplantar no revisten complejidad. En segundo lugar, la inflamación que produce cursa con una hipersensibilidad térmica y mecánica bien descrita, y, en tercer lugar, esta hipersensibilidad se prolonga durante varios días, llegando a alcanzar, según algunos estudios, hasta 14 días (Shinoda et al. 2011; Zhao et al. 2015; Pitzer et al. 2016; Sheahan et al. 2017). Esta duración prolongada de la hipersensibilidad térmica es importante para hacer uso del ratón transgénico TRAP2, que como se ha mencionado, requiere de un tiempo mínimo tras el estímulo “aTRAPador” para la correcta expresión del reportero. Nuestros resultados conductuales confirman los observados en la literatura: los ratones inyectados con CFA mostraron una marcada hiperalgesia térmica y mecánica y un edema evidente que persistía hasta el momento del sacrificio, 8 días después de la inyección. Nos centramos a continuación en estudiar los circuitos que participan en la transmisión de modalidades concretas de dolor, como es el dolor térmico, estudiando las poblaciones que participan en su codificación en situaciones de dolor agudo e inflamatorio.

5.4. cFos como marcador de actividad neuronal en la médula espinal

Para la identificación de los circuitos neuronales involucrados en la transmisión del dolor, nos decidimos por una estrategia basada en la expresión del gen *cfos*, concretamente, el ratón transgénico TRAP2, que nos permitía el marcaje permanente de circuitos activos. En primer lugar, se caracterizó la expresión de la proteína cFos en el asta dorsal tras la aplicación de pulsos de calor nocivo. Como se ha descrito extensamente (Hunt et al. 1987; Bullitt 1990; Doyle y Hunt

1999; Todd et al. 2005; Polgár et al. 2008; Cavanaugh et al. 2009), la aplicación de calor nocivo en la pata induce la expresión de cFos en el asta dorsal ipsilateral a la estimulación, especialmente en las láminas más superficiales y en su porción más medial. Además, en nuestros experimentos, este aumento era especialmente evidente en las regiones lumbares L4-L5, que reciben inervación de la extremidad posterior (Rigaud et al. 2008; da Silva Serra et al. 2016). El número de estímulos aplicados constituyó un factor importante en la inducción de cFos, aumentando ésta de manera proporcional. Esta relación entre la duración del estímulo y la expresión de cFos ya se había observado en trabajos previos, donde los estímulos eléctricos más prolongados aumentaban el número de neuronas cFos⁺ y sus niveles de expresión en médula espinal dorsal (Bullitt et al. 1992). Ocurre lo mismo en las astas ventrales, donde una actividad locomotora más prolongada induce una mayor expresión (Ahn et al. 2006). Pero también la intensidad del estímulo influye significativamente en la expresión de cFos. En experimentos donde se aplicaban señales acústicas, el número de neuronas que expresaban cFos en los núcleos cocleares aumentó a medida que aumenta la intensidad del tono (Saint Marie, Luo, y Ryan 1999). Por tanto, la expresión de cFos depende tanto de la intensidad del estímulo como de la frecuencia con la que éste se aplica (Sheng, Fields, y Nelson 1993).

5.5. El ratón TRAP2: imagen fija de la actividad neuronal

El siguiente paso consistió en la validación del ratón TRAP2-tdTomato como modelo para el marcaje permanente de poblaciones neuronales activas. Este modelo se ha utilizado sobre todo para el estudio de la actividad de distintos núcleos cerebrales (Guenthner et al. 2013; Allen et al. 2017; Corder et al. 2019; DeNardo et al. 2019; Koutlas et al. 2022), pero menos frecuentemente para marcar neuronas en médula espinal (Pham et al. 2020), y sólo recientemente para definir poblaciones espinales sensoriales (Brown et al. 2022; Targowska-Duda et al. 2024). Un control importante fue comprobar que la recombinación únicamente ocurría en presencia del 4-OHT, ya que algunas líneas CreER^{T2} presentan recombinación independiente de la administración del 4-OHT debido a un efecto espurio de la CreER^{T2} (Madisen et al. 2010). Entre ellas se encuentra la línea Arc TRAP, que utiliza la misma estrategia que el TRAP2, pero utilizando el promotor de otro gen de expresión temprana, Arc, en lugar de cFos. En este caso, se encontró una expresión significativa del reportero en varias áreas cerebrales incluso en ausencia de 4-OHT, quizá debido al alto nivel de expresión de esta proteína (Guenthner et al. 2013). En nuestro caso, no se

observa esta actividad espuria, ya que en ausencia de 4-OHT muy pocas células expresan tdTomato. Este dato coincide con experimentos previos con el ratón TRAP1 y TRAP2, en los que se encuentran muy pocas células donde ocurra la recombinación en ausencia de 4-OHT (Guenthner et al. 2013; DeNardo et al. 2019).

Además de la dependencia de 4-OHT para que ocurra la recombinación, fue también necesario confirmar la asociación del marcaje tdTomato con el estímulo mediante la comparación del lado estimulado con el no estimulado. Al igual que ocurre en los experimentos de inmunohistoquímica de cFos, el lado estimulado presenta un número significativamente mayor de neuronas marcadas que el lado contralateral en láminas superficiales, debido a que es fundamentalmente a estas láminas donde proyectan los nociceptores (Todd 2010). Resulta llamativo, además, que la mayor parte de células marcadas se localizan en la porción medial de las astas dorsales de la médula espinal. Este patrón se ha observado también en otros trabajos que aplican una estimulación térmica en la extremidad posterior para inducir cFos en médula espinal, ya sea mediante calor radiante (Hunt et al. 1987) o inmersión de la pata en agua caliente (Cavanaugh et al. 2009), y corresponde a la terminación somatotópica de las fibras aferentes en la médula espinal. La extremidad posterior del ratón está inervada por el nervio ciático, que deriva de la rama ventral del nervio espinal (Jenkins y Tubbs 2021). Experimentos de trazado de fibras han demostrado que los nervios que derivan de esta rama, entre ellos el ciático, terminan en la porción más medial del asta dorsal de la médula espinal (Grant et al. 1979; Molander 1986), lo que coincide con nuestro patrón de marcaje de cFos y tdTomato tras la estimulación de la extremidad posterior.

Sin embargo, es cierto que, tanto en los experimentos de expresión de cFos como en los que se emplea el ratón TRAP2, se observa un marcaje de neuronas también en las capas profundas de la médula espinal, y no sólo en las superficiales, tras la aplicación unilateral de un estímulo doloroso. Este marcaje puede tener varias explicaciones. Por un lado, teniendo en cuenta que el tamoxifeno abre una ventana de varias horas en las que toda neurona activa es susceptible de recombinar y expresar el reportero, es de esperar que interneuronas de láminas profundas que reciben información de tacto inocuo (Basbaum et al. 2009) se activen en ambos lados a causa de la actividad normal de los ratones tras el experimento. Por otro lado, la profusión de conductas de lamida de la pata tras la estimulación dolorosa puede explicar un posible marcaje más abundante en el lado estimulado a causa de esa estimulación mecánica de bajo umbral. En último lugar, aunque en este trabajo no se han cuantificado las neuronas en estas capas profundas, la lámina V también contiene neuronas de proyección que reciben información tanto

nociva como no nociva, que pueden estar activándose tras los estímulos de calor nocivo (Todd 2010).

Otro de los controles fundamentales para la utilización fiable del modelo de ratón TRAP2 para el marcaje de poblaciones neuronales era el destinado a descartar la recombinación en células gliales, puesto que la expresión de cFos se ha descrito en trabajos previos tanto en astrocitos (McNaughton y Hunt 1992) como en microglía (Eun et al. 2004). Sin embargo, en estos estudios, la expresión de genes de expresión temprana responde a la activación y proliferación en respuesta a la lesión y al daño tisular, y no a los estímulos despolarizantes que sí la inducen en neuronas (Hisanaga et al. 1990; Cruz-Mendoza et al. 2022). Esto encaja con lo que observamos en la médula espinal, donde no se produjo recombinación ni en astrocitos ni en microglía en respuestas a estímulos térmicos.

No obstante, es curioso lo observado en secciones de DRG. Existe controversia sobre la expresión de cFos en neuronas sensoriales primarias: mientras que clásicamente se ha observado y aceptado que estas neuronas no expresan cFos (pero sí otros genes marcadores de actividad de expresión temprana, como pERK) (Hunt et al. 1987; Gao y Ji 2009; Miao et al. 2022), otros trabajos encuentran que tras condiciones determinadas de estimulación o de lesión, cFos puede ser detectado mediante técnicas de inmunohistoquímica en neuronas del DRG (Sheng et al. 1993; Romero et al. 2011). Los resultados de esta tesis no pueden confirmar o descartar la expresión de cFos, pero en caso de existir, no alcanza los niveles críticos para desencadenar la recombinación en el ratón TRAP2. Donde sí ocurre la recombinación es en pequeñas células gliales satélite en el DRG, que son células de soporte que rodean a las neuronas sensoriales y pueden modular su actividad (Hanani y Spray 2020). Se ha descrito en estas células la expresión de cFos en situaciones de daño neuropático (Soares, Chen, y Morgan 2001), aunque poco se sabe sobre su expresión en condiciones basales o tras la estimulación de la terminación sensorial. Sin embargo, no se estudió la expresión bilateral de tdTomato en este tipo celular, por lo que no se puede asegurar que la recombinación esté asociada al estímulo aplicado. Una futura línea de investigación podría estudiar la expresión en estas células de estos genes de expresión temprana en respuesta a estimulación inocua o nociva, su efecto y su posible función.

5.5.1. Inestabilidad de los circuitos neuronales de la médula espinal dorsal

5.5.1.1. Resultados en condiciones fisiológicas

Como el “aTRAPamiento” y consecuente expresión de tdTomato depende de la expresión de cFos, hipotetizamos que, ante el mismo estímulo, las neuronas espinales que respondiesen a él se marcarían con ambos marcadores. Como el reportero dependiente de Cre requiere varios días para alcanzar su expresión completa (Guenthner et al. 2013; DeNardo et al. 2019), se aplicaron dos estímulos, el primero después de la administración de 4-OHT que “aTRAPó” a las neuronas activadas, y una segunda tras la cual se llevó a cabo la inmunohistoquímica contra cFos. Al comparar ambos marcajes obtenidos en respuesta al mismo estímulo se observaron algunos detalles interesantes.

Por una parte, ambos marcajes se concentran en las láminas superficiales del asta dorsal, especialmente en la porción medial, dato que ya se ha discutido anteriormente. Sin embargo, el número de células tdTomato⁺ en el ratón TRAP2 es aproximadamente la mitad de las marcadas por el anticuerpo anti-cFos. Este resultado se puede explicar por una reducida eficiencia de recombinación de la Cre. La frecuencia de recombinación en un sistema Cre-loxP es proporcional a la actividad del promotor, por lo que la expresión de cFos (y con ello, la expresión de Cre), debe alcanzar un nivel umbral para que se produzca la recombinación (Araki et al. 1997). Mientras que la expresión de cFos constituye una variable continua proporcional a la actividad celular, la recombinación es dicotómica (Guenthner et al. 2013), pudiendo ocurrir o no ocurrir. Es posible que, de todo el conjunto de células que expresan cFos en niveles detectables por la histoquímica, sólo la mitad alcance los niveles de expresión críticos para desencadenar la recombinación. Otros trabajos han encontrado resultados similares en médula espinal, donde el mismo patrón de actividad locomotora genera más marcaje en inmunohistoquímicas de cFos que neuronas “aTRAPadas” (Pham et al. 2020).

Por otro lado, llama la atención el bajo grado de colocalización, es decir, el mismo estímulo, aplicado con una diferencia de 7 días, provocó la activación de poblaciones diferentes. Más concretamente, de la población tdTomato⁺ (la que respondió al primer estímulo), sólo cerca de un 40 % responde al segundo estímulo nocivo, y esto ocurre tanto en la lámina I como en la II. Curiosamente, otros trabajos que también utilizan esta aproximación para reactivar circuitos con el ratón TRAP2 encuentran resultados similares en diferentes sistemas. Así, en la médula

espinal ventral, se ha demostrado que sólo un 20 % de las neuronas “aTRAPadas” tras un primer episodio de marcha en cinta de correr se reactivaban cuando se repetía la misma marcha 14 días después (Pham et al. 2020). En los núcleos cocleares, sólo un 30-40 % de las neuronas “aTRAPadas” tras la aplicación de una señal sonora se reactivaban cuando 5 días después se repetía la misma frecuencia (Guenthner et al. 2013). Y en la corteza prelámbica, entre un 20 y un 50 % de las neuronas “aTRAPadas” durante el establecimiento de un condicionamiento clásico son reactivadas al repetir el tono condicionante (DeNardo et al. 2019).

Este resultado abre la puerta a varias interpretaciones. Una es que exista redundancia entre circuitos de la médula espinal dorsal, entendiendo que varios circuitos diferentes puedan ser reclutados por el mismo tipo de estímulo, y que el reclutamiento de uno u otro sea un proceso estocástico. Otra posible explicación es que exista un único circuito para esa modalidad sensorial, pero que presente una tasa de reestructuración y renovación tan alta que, en el periodo de 7 días, sufra grandes modificaciones. Ambos escenarios pueden darse al mismo tiempo, teniendo en cuenta el alto grado de complejidad y plasticidad de un sistema como la médula espinal, donde, además de haberse descrito numerosos procesos de reestructuración de circuitos (Tahayori y Koceja 2012; Bonin y De Koninck 2014), también se ha reportado la migración y maduración de neuronas inmaduras desde el canal central para pasar a integrar los circuitos, especialmente, del asta dorsal (Shechter, Ziv, y Schwartz 2007; Rusanescu 2016). No obstante, es necesario llevar a cabo más experimentos para dilucidar esta cuestión. Un posible abordaje es el registro *in vivo* de los circuitos espinales. Desde los experimentos pioneros del grupo de Kerschensteiner en los que se logró la visualización *in vivo* de axones fluorescentes y su degeneración tras lesión medular (Kerschensteiner et al. 2005), esta técnica ha evolucionado hasta permitir la captura de imágenes de la médula espinal de ratones mientras se mueven libremente (Shekhtmeyster et al. 2023). Esto se puede combinar con técnicas de optogenética, que permiten estimular los circuitos a nivel de la neurona sensorial, la espinal o la descendente, y con marcadores de los niveles del calcio intracelular, como el GCaMP6f, para estudiar los circuitos que se activan tras la aplicación de distintos estímulos y su evolución a lo largo del tiempo (Sekiguchi et al. 2016; Harding, Fung, y Bonin 2020). Algunos ejemplos de esto son los trabajos de Ran y colaboradores y Sullivan y Sdrulla, en los que aplican diferentes estímulos mecánicos y térmicos y miden los aumentos de calcio intracelular de las neuronas excitatorias e inhibitorias de las capas superficiales de médula espinal (Ran, Kamalani, y Chen 2021; Sullivan y Sdrulla 2022)

5.5.1.2. Resultados en condiciones de inflamación

En condiciones inflamatorias, se observaron resultados similares a los que describimos en condiciones fisiológicas. Se indujo un primer “aTRAPamiento” mediante estimulación con calor (52 °C) en la fase temprana de la inflamación y, 7 días después, en una fase tardía de la inflamación, se repitió la estimulación y se llevó a cabo la inmunohistoquímica para cFos. Al igual que en la situación control, el marcaje de cFos fue mucho más abundante que el de tdTomato, y el grado de reactivación fue muy reducido. Pero, lo que llama especialmente la atención es que el estímulo térmico doloroso en condiciones inflamatorias activó el mismo número de células del asta dorsal que en condiciones normales, a pesar de que los resultados de los experimentos comportamentales dejan claro que el umbral térmico desciende notablemente tras la administración de CFA. Esta sensibilización, por tanto, no se debe a una expansión de la población de neuronas que se activan tras la aplicación del estímulo térmico. Es posible que la población que recibe los “inputs” sea siempre la misma, pero en un proceso inflamatorio su actividad sea mayor, lo que se traduce en el desarrollo de la hiperalgesia. En este sentido, son varias las adaptaciones que pueden tener lugar a nivel central para facilitar la transmisión de información nociceptiva térmica en condiciones inflamatorias. Entre ellas están la activación de astrocitos y microglía espinales, involucrada en el desarrollo de la hiperalgesia térmica (Zhao et al. 2015; Wang et al. 2023), los mecanismos de desinhibición, por los que disminuye la actividad inhibitoria que frenaría, en condiciones normales, la transmisión de dolor (Harvey et al. 2004), o la facilitación sináptica sobre las neuronas de segundo orden, caracterizada por el aumento de las corrientes postsinápticas excitatorias (Huang et al. 2019). Además de todos estos mecanismos, se ha descrito también que la remodelación de los circuitos que establecen las interneuronas excitatorias entre sí y con las neuronas de proyección contribuye al desarrollo de la hiperalgesia mecánica. Por ejemplo, las poblaciones somatostatina positivas (SS⁺), PKCγ⁺ y calretinina positivas (CR⁺) parecen participar de este proceso (Christensen et al. 2016; Alba-Delgado et al. 2018; Peirs et al. 2021). Para comprobar si alguno de estos mecanismos pudiera estar teniendo lugar, se llevaron a cabo experimentos de electrofisiología en rodajas de médula espinal, cuyos resultados se discuten más adelante.

5.5.1.3. *Resultados tras estímulos térmicos de diferente intensidad*

Si una segunda estimulación de la misma naturaleza que la primera activa una población mayoritariamente diferente a ésta, no es de extrañar que, cuando el estímulo es diferente, el porcentaje de co-localización entre tdTomato y cFos sea aún menor. Es lo que observamos cuando “aTRAPamos” con un estímulo de calor nocivo y, unos días después, inducimos una inflamación periférica y aplicamos un estímulo de calor inocuo (42°C). Esta estimulación no nociva, en condiciones normales, induce la expresión de cFos en un bajo número de neuronas del asta dorsal (Hunt et al. 1987; Abbadie et al. 1994). Sin embargo, encontramos que aplicar esta estimulación en el grupo inflamado induce una expresión mucho mayor. Estos resultados corroboran estudios previos que mostraron un aumento significativo de la expresión de cFos en la médula espinal dorsal ante estímulos mecánicos en modelos de dolor inflamatorio o neuropático, en comparación con una respuesta limitada en condiciones fisiológicas (Molander, Hongpaisan, y Persson 1994; Ma y Woolf 1996). El estímulo térmico de 42 °C, en el contexto inflamatorio, produce respuestas nocifensivas similares a las que se observan con el estímulo nocivo (52°C) (Shao 2023). Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, aunque el efecto comportamental de ambos tipos de estímulos sea la misma conducta aversiva, los circuitos que parecen integrar la información varían enormemente de unas condiciones a otras, demostrando la diversidad de los circuitos espinales y su probable convergencia en centros superiores.

Queremos resaltar varias limitaciones de nuestro estudio. La primera tiene que ver con la propia herramienta TRAP pues, en este modelo, la recombinación es una valoración indirecta de la expresión de cFos, y su condición binaria impide evaluar el nivel de expresión de esta proteína. La segunda, que constituye uno de los objetivos futuros de este estudio, es que queda por conocer la identidad molecular de esta población (o poblaciones) que responde a altas temperaturas en condiciones normales e inflamatorias. Son varias las estrategias que pueden adoptarse en este sentido, siendo la inmunohistoquímica una de las más accesibles. Existen muchos anticuerpos comerciales dirigidos a reconocer los péptidos y proteínas que constituyen los marcadores de subpoblaciones de interneuronas (Todd 2017). Otros, como los dirigidos contra Lmx1b o Pax2, permiten diferenciar la población excitatoria e inhibitoria respectivamente (Szabo et al. 2015; Larsson 2017). Estos dos últimos anticuerpos se utilizaron en nuestros experimentos, pero no funcionaron adecuadamente. Una alternativa es utilizar ratones transgénicos donde estas poblaciones se marquen por algún reportero fluorescente, ya sea

dependiente de recombinasas o incluido en un BAC (Chattopadhyaya et al. 2004; Browne et al. 2020), aunque se debe tener en cuenta la dificultad que presenta combinar estas herramientas con el ratón TRAP, puesto que se deben generar ratones triples o cuádruples transgénicos que incluyan todos los constructos deseados. Además de la inmunohistoquímica, el marcaje permanente de neuronas permite su posterior caracterización molecular mediante varias técnicas, como la hibridación *in situ*, para la detección de secuencias específicas de ARN en rodajas de tejido (Zhi et al. 2022), o incluso una combinación entre hibridación *in situ* e inmunohistoquímica (Meng, Zhao, y Lao 2018). Las técnicas de secuenciación de célula única, por otro lado, permitirían elaborar un perfil transcriptómico de estas interneuronas en diferentes condiciones (Häring et al. 2018), y técnicas novedosas, como la técnica TRAP (no debe confundirse con el ratón TRAP; en este caso, corresponde a las siglas en inglés de Purificación por Afinidad de Ribosomas Traductores), pueden permitir caracterizar el traductoma (es decir, los ARN mensajeros que no sólo se transcriben, sino que se también se traducen en proteínas) de estas células (Das Gupta et al. 2021). La combinación de estas técnicas con el modelo TRAP2 permitiría conocer en detalle la identidad de esta y otras poblaciones espinales, facilitando así el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas de manejo del dolor al identificar dianas moleculares clave implicadas en la transmisión y modulación de estas señales en condiciones normales e inflamatorias.

5.5.2. Caracterización funcional de las neuronas espinales sensibles a calor y sus adaptaciones en contextos inflamatorios

Lo que sí nos permite la herramienta TRAP2 es conocer la identidad funcional de la población que responde a calor y las modificaciones que sufre en contextos inflamatorios, gracias a su capacidad de marcar permanentemente poblaciones activas.

5.5.2.1. *Modificaciones funcionales tras la inflamación inducida por CFA*

Se han descrito varios mecanismos mediante los cuales el CFA induce hipersensibilidad térmica. Entre ellos, destaca el aumento de expresión de canales sensibles a calor como TRPV1 y TRPM3 en neuronas sensoriales (Shinoda et al. 2011; Krügel et al. 2017), así como de canales de sodio dependientes de voltaje (Gould et al. 2004), provocando un aumento en la excitabilidad

de estas neuronas (Duzhy et al. 2021). Además, la inyección periférica de CFA induce la activación en médula espinal de astrocitos y células microgliales, lo que aumenta la transmisión sináptica en el asta dorsal (Zhao et al. 2015; Lu et al. 2021; Wang et al. 2023). Pero, ¿qué efecto puede tener la inflamación inducida por CFA sobre las interneuronas del asta dorsal de la médula espinal? Nuestros resultados muestran que la inflamación no provoca cambios en el potencial de reposo de las interneuronas del asta dorsal ni en su reobase, coincidiendo con resultados de otros trabajos en modelos tanto neuropáticos como inflamatorios (Balasubramanyan et al. 2006; Kopach et al. 2023). De la misma manera, esos trabajos tampoco encuentran diferencias en el patrón de disparo de potenciales de acción tras la inyección de corriente entre los grupos CFA y vehículo. Lo que sí se constata en esta tesis es un aumento en la frecuencia y la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (sEPSCs) sobre las neuronas de lámina II tras la inflamación con CFA. Este aumento del “input” sináptico excitatorio sobre estas neuronas ya había sido descrito previamente en modelos de dolor neuropático (Balasubramanyan et al. 2006; Chen et al. 2018), sin ser del todo claro en modelos inflamatorios: mientras que algunos trabajos sí observan un aumento de la frecuencia y amplitud de sEPSC en lámina II (Kopach et al. 2015), otros ven restringido este efecto a lámina I (Huang et al. 2019).

El glutamato es el neurotransmisor que liberan mayoritariamente los nociceptores en médula espinal (Basbaum et al. 2009), y también las interneuronas excitatorias de esta región (Todd 2010). Ya sea tras un daño neuropático o en un proceso inflamatorio, el aumento del input excitatorio está provocado por un aumento de la señalización glutamatérgica (Sasaki, Tohda, y Kuraishi 1998), cuya causa se ha atribuido a varios factores. Uno de ellos es el desequilibrio entre liberación y recaptación de glutamato, que es retirado de la hendidura sináptica por los astrocitos (Rothstein et al. 1996). De hecho, la sobreexpresión de transportadores de glutamato que retiran el exceso de neurotransmisor atenúa el desarrollo de la hipersensibilidad inflamatoria (Maeda et al. 2008), y su inhibición induce hiperalgesia y aumento de la amplitud y duración de los EPSCs (Weng, Chen, y Cata 2006). Otro factor es el aumento de expresión, tráfico y sensibilidad de los receptores de glutamato AMPA-R en las sinapsis establecidas por la terminal periférica y la neurona espinal, lo que provoca un aumento de la actividad excitatoria sobre esta última (Kopach et al. 2011; Chen et al. 2018; Kopach et al. 2023). De hecho, su bloqueo revierte la hiperalgesia térmica y mecánica inducida por el CFA (Park et al. 2008; Kopach et al. 2023). Además, juegan un papel importante los canales TRPV1 y TRPA1 presentes en el terminal presináptico. Su inhibición a nivel de médula espinal reduce la actividad glutamatérgica de las neuronas sensoriales sobre neuronas espinales reduciendo la hipersensibilidad inducida por CFA, por lo que se postula que su activación mediante agonistas endógenos como la

bradiquinina permite el mantenimiento de la hipersensibilidad térmica y mecánica inducida por el CFA (Huang et al. 2019). En nuestro caso, la utilización de bloqueantes o moduladores de los receptores de glutamato y de los canales TRPA1 y TRPV1 puede ser un abordaje interesante para dilucidar esta cuestión.

5.5.2.2. Identidad funcional de la población de neuronas espinales sensibles a calor

Las modificaciones inducidas por CFA en las neuronas del asta dorsal descritas anteriormente se observaron tras agrupar los resultados obtenidos tanto en neuronas tdTomato⁺ como en tdTomato⁻, es decir, son modificaciones que se dan en neuronas del asta dorsal independientemente de su sensibilidad al calor. De hecho, al segregar los resultados en función de la expresión del marcador tdTomato, no se observó una diferencia significativa en la frecuencia y amplitud de los sEPSCs (aunque sí una tendencia) entre el grupo control y el grupo CFA para ninguna de las dos poblaciones (tdTomato⁺ y tdTomato⁻). Esto puede deberse a un tamaño muestral demasiado pequeño, y sólo cuando se combinan ambas poblaciones se alcanza un tamaño muestral suficiente para observar diferencias significativas. Además, hay que tener en cuenta una limitación metodológica importante. Como se ha demostrado anteriormente, la eficiencia del “aTRAPamiento” no es del 100 %, por lo que no podemos asegurar que una neurona tdTomato⁻ sea insensible a calor. En las comparaciones que se muestran aquí, se toma como población sensible a calor el conjunto de neuronas tdTomato⁺, que constituyen una fracción de toda la población que se activa con este estímulo.

Separar los resultados obtenidos en poblaciones tdTomato⁺ y tdTomato⁻ nos permite, por otro lado, abordar la identificación funcional de la población de neuronas del asta dorsal sensibles a calor. Observamos que no hay diferencias en el potencial de membrana de reposo, la reobase o el input excitatorio entre estas neuronas y las que presumiblemente no se activan por calor nocivo. Sin embargo, sí que se observa una tendencia clara en estas neuronas a responder a la inyección de corriente disparando potenciales de acción con un patrón tónico, en condiciones tanto fisiológicas como inflamatorias. Este patrón de disparo, determinado por las corrientes subumbrales de potasio y calcio activadas por voltaje (Browne et al. 2020), se ha relacionado estrechamente con la naturaleza excitatoria o inhibitoria de las interneuronas donde se presenta. Varios trabajos asignan a la mayoría de las neuronas inhibitorias un patrón tónico (Punnakkal et al. 2014; Browne et al. 2020), debido en gran parte a la presencia en estas

células de corrientes retardadas rectificadoras de potasio. Estas corrientes se activan rápidamente durante la fase ascendente del potencial de acción, resultando en una repolarización rápida de la membrana, y se inactivan también rápidamente permitiendo los subsiguientes disparos de potenciales de acción (Rudy y McBain 2001). Entre los canales que conducen esas corrientes se encuentran los de la subfamilia Kv3, especialmente los formados por las subunidades Kv3.1, Kv3.2 y Kv3.4 (Erisir et al. 1999; Baranauskas et al. 2003). Por otro lado, los patrones de disparo inicial, retrasado y simple son mucho más comunes en neuronas excitatorias (Punnakkal et al. 2014; Browne et al. 2020), con corrientes de salida de potasio tipo A que retrasan el disparo de potenciales de acción (Heinke et al. 2004; Hu y Gereau 2011; Sinha et al. 2021). ¿Es posible que más del 50% de las neuronas activadas por calor sean inhibitorias, basándonos en los patrones de disparo observados? Es atrevido inferir la identidad molecular de estas neuronas sólo en base a su patrón de disparo, pues ni el patrón tónico es exclusivo de las inhibitorias ni el resto de patrones lo son de las excitatorias. Además, trabajos recientes sugieren que la población activada por calor nocivo es mayoritariamente excitatoria (Häring et al. 2018; H. Wang et al. 2022). Sin embargo, en estos trabajos las herramientas y los tiempos manejados son diferentes a las utilizadas en esta tesis. En el caso de Häring y colaboradores, el marcador de actividad neuronal es el gen de expresión inmediata temprana *arc*, más selectivo que *cfos* (Jiang y VanDongen 2021), y quizá sesgado hacia circuitos monosinápticos en los que las interneuronas inhibitorias pierden protagonismo (Häring et al. 2018).

Por otro lado, Wang y colaboradores sí utilizan un ratón transgénico con un reportero dependiente de *cfos*. Este último trabajo es muy interesante, porque explora la identidad de las interneuronas del asta dorsal sensibles a calor e identifica una población, la de las interneuronas excitatorias que expresan la tirosina quinasa ErbB4, como una de las más importantes en el procesamiento de esta modalidad sensorial (H. Wang et al. 2022). Sin embargo, otros trabajos apuntan en otra dirección, localizando ErbB4 principalmente en interneuronas inhibitorias positivas para parvalbúmina (PV⁺) tanto en el hipocampo (Yin et al. 2013) como en médula espinal (Yu et al. 2021), donde su activación participa en la internalización de receptores AMPA en esas células PV⁺. Esto disminuye su actividad inhibitoria, provocando alodinia mecánica en modelos de dolor neuropático pero, curiosa y contrariamente a lo apuntado por Wang y colaboradores, sin afectar a la sensibilidad térmica (Yu et al. 2021). En resumen, es posible que entre las neuronas que “aTRAPamos” se encuentren las mencionadas ErbB4⁺, pero se requieren más experimentos que esclarezcan la naturaleza molecular y bioquímica de estos circuitos.





6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS



1. Las neuronas sensoriales que expresan el canal nociceptivo TRPA1 se expresan en los ganglios raquídeos y vagales, innervando órganos internos y externos.
2. Las neuronas TRPA1⁺ de los ganglios raquídeos expresan predominantemente marcadores de nociceptores no peptidérgicos y sus terminales centrales penetran en la médula espinal hasta la porción interna de la lámina II.
3. El ratón transgénico TRPA1-ChR2-EYFP permite el estudio de una porción de esta población neuronal y su activación selectiva *in vivo*, al expresar el constructo ChR2-EYFP únicamente en neuronas TRPA1⁺. La activación selectiva de esta población neuronal en la pata del ratón origina comportamientos aversivos.
4. El ratón transgénico TRAP2 cruzado con el reportero tdTomato permite el marcaje o “aTRAPamiento” permanente de una parte de la población total de neuronas espinales que se activa tras la aplicación de un estímulo nocivo periférico.
5. Los circuitos espinales que integran la información nociva térmica son diferentes si la estimulación se aplica en diferentes puntos temporales, y esta población de neuronas espinales no aumenta en condiciones inflamatorias.
6. La información térmica inocua, percibida como tal en el ambiente fisiológico y como un estímulo nocivo (alodinia) en el ambiente inflamatorio, es integrada por circuitos diferentes a los que intervienen durante la codificación de la información nociva aguda en la médula espinal.
7. La inflamación periférica con CFA induce un aumento en la frecuencia y amplitud de las corrientes excitatorias postsinápticas espontáneas sobre las neuronas espinales de las láminas superficiales.
8. La población de neuronas espinales reclutada por un estímulo térmico nocivo dispara potenciales de acción con un patrón predominantemente tónico.

1. Sensory neurons expressing the nociceptive TRPA1 channel are located in dorsal root and vagal ganglia, innervating both internal and external organs.
2. TRPA1⁺ neurons in dorsal root ganglia predominantly express non-peptidergic nociceptor markers, and their central terminals extend into the spinal cord, reaching the inner portion of lamina II.
3. The TRPA1-ChR2-EYFP transgenic mouse allows the study of a subset of this neuronal population and its selective activation *in vivo* by expressing the ChR2-EYFP construct exclusively in TRPA1⁺ neurons. Selective activation of this neuronal population in the mouse paw triggers aversive behaviors.
4. The TRAP2 transgenic mouse crossed with the tdTomato reporter enables the labeling or permanent “TRAPping” of a portion of the total population of spinal neurons activated following the application of a peripheral nociceptive stimulus.
5. Spinal circuits integrating thermal nociceptive information differ depending on the temporal point of stimulation, and this population of spinal neurons does not increase under inflammatory conditions.
6. Innocuous thermal information, perceived as such in a physiological environment but as a nociceptive stimulus (allodynia) in an inflammatory environment, is integrated by circuits distinct from those involved in the encoding of acute nociceptive information in the spinal cord.
7. Peripheral inflammation induced by CFA leads to an increase in the frequency and amplitude of spontaneous excitatory postsynaptic currents in superficial spinal neurons.
8. The population of spinal neurons recruited by a nociceptive thermal stimulus fires action potentials in a predominantly tonic pattern.





7. BIBLIOGRAFÍA



- Abbadie, Catherine, Prisca Honoré, Marie-Claude Fournié-Zaluski, Bernard P. Roques, y Jean-Marie Besson. 1994. «Effects of Opioids and Non-Opioids on c-Fos-like Immunoreactivity Induced in Rat Lumbar Spinal Cord Neurons by Noxious Heat Stimulation». *European Journal of Pharmacology* 258(3):215-27. doi: 10.1016/0014-2999(94)90483-9.
- Abdallah, Khaled, Francis Nadeau, Francis Bergeron, Sylvie Blouin, Véronique Blais, Kelly M. Bradbury, Christine L. Lavoie, Jean-Luc Parent, y Louis Gendron. 2018. «Adeno-Associated Virus 2/9 Delivery of Cre Recombinase in Mouse Primary Afferents». *Scientific Reports* 8(1):7321. doi: 10.1038/s41598-018-25626-y.
- Abooj, Mruvil, Mahendra Bishnoi, Christine A. Bosgraaf, y Louis S. Premkumar. 2016. «Changes in Spinal Cord Following Inflammatory and Neuropathic Pain and the Effectiveness of Resiniferatoxin». *The Open Pain Journal* 9(1):1-14. doi: 10.2174/1876386301609010001.
- Abraira, Victoria E., y David D. Ginty. 2013. «The Sensory Neurons of Touch». *Neuron* 79(4):618-39. doi: 10.1016/j.neuron.2013.07.051.
- Abraira, Victoria E., Emily D. Kuehn, Anda M. Chirila, Mark W. Springel, Alexis A. Toliver, Amanda L. Zimmerman, Lauren L. Orefice, Kieran A. Boyle, Ling Bai, Bryan J. Song, Karleena A. Bashista, Thomas G. O'Neill, Justin Zhuo, Connie Tsan, Jessica Hoynoski, Michael Rutlin, Laura Kus, Vera Niederkofler, Masahiko Watanabe, Susan M. Dymecki, Sacha B. Nelson, Nathaniel Heintz, David I. Hughes, y David D. Ginty. 2017. «The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn». *Cell* 168(1):295-310.e19. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.010.
- Aghajanian, G. K., y K. Rasmussen. 1989. «Intracellular Studies in the Facial Nucleus Illustrating a Simple New Method for Obtaining Viable Motoneurons in Adult Rat Brain Slices». *Synapse (New York, N.Y.)* 3(4):331-38. doi: 10.1002/syn.890030406.
- Ahn, S. N., J. J. Guu, A. J. Tobin, V. R. Edgerton, y N. J. K. Tillakaratne. 2006. «Use of C-Fos to Identify Activity-Dependent Spinal Neurons after Stepping in Intact Adult Rats». *Spinal Cord* 44(9):547-59. doi: 10.1038/sj.sc.3101862.
- Akerman, Simon, y Marcela Romero-Reyes. 2020. «Vagus Nerve Stimulation». Pp. 87-98 en *Neuromodulation in Headache and Facial Pain Management: Principles, Rationale and Clinical Data, Headache*, editado por G. Lambru y M. Lanteri-Minet. Cham: Springer International Publishing.
- Alba-Delgado, Cristina, Sarah Mountadem, Noémie Mermet-Joret, Lénaïc Monconduit, Radhouane Dallel, Alain Artola, y Myriam Antri. 2018. «5-HT_{2A} Receptor-Induced Morphological Reorganization of PKC γ -Expressing Interneurons Gates Inflammatory Mechanical Allodynia in Rat». *Journal of Neuroscience* 38(49):10489-504. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1294-18.2018.
- Al-Khater, Khulood M., y Andrew J. Todd. 2009. «Collateral Projections of Neurons in Laminae I, III, and IV of Rat Spinal Cord to Thalamus, Periaqueductal Gray Matter, and Lateral Parabrachial Area». *The Journal of Comparative Neurology* 515(6):629-46. doi: 10.1002/cne.22081.
- Allen, William E., Laura A. DeNardo, Michael Z. Chen, Cindy D. Liu, Kyle M. Loh, Lief E. Fenno, Charu Ramakrishnan, Karl Deisseroth, y Lihun Luo. 2017. «Thirst-Associated Preoptic

- Neurons Encode an Aversive Motivational Drive». *Science (New York, N.Y.)* 357(6356):1149-55. doi: 10.1126/science.aan6747.
- Almarestani, L., S. M. Waters, J. E. Krause, G. J. Bennett, y A. Ribeiro-da-Silva. 2009. «De Novo Expression of the Neurokinin 1 Receptor in Spinal Lamina I Pyramidal Neurons in Polyarthritis». *The Journal of Comparative Neurology* 514(3):284-95. doi: 10.1002/cne.22024.
- Altarifi, Ahmad, Mohammad Alsalem, y Ayman Mustafa. 2019. «Effects of intraplantar administration of Complete Freund's Adjuvant (CFA) on rotarod performance in mice». *Scandinavian Journal of Pain*. doi: 10.1515/sjpain-2018-0358.
- Andersson, David A., Clive Gentry, Sian Moss, y Stuart Bevan. 2008. «Transient Receptor Potential A1 Is a Sensory Receptor for Multiple Products of Oxidative Stress». *The Journal of Neuroscience* 28(10):2485-94. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5369-07.2008.
- Araki, K., T. Imaizumi, K. Okuyama, Y. Oike, y K. Yamamura. 1997. «Efficiency of Recombination by Cre Transient Expression in Embryonic Stem Cells: Comparison of Various Promoters». *Journal of Biochemistry* 122(5):977-82. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021860.
- Arle, Jeffrey, y Jay L. Shils. 2022. *Essential Neuromodulation*. Academic Press.
- Artola, Alain, Daniel Voisin, y Radhouane Dallel. 2020. «PKC γ Interneurons, a Gateway to Pathological Pain in the Dorsal Horn». *Journal of Neural Transmission* 127(4):527-40. doi: 10.1007/s00702-020-02162-6.
- Averill, S., S. B. McMahon, D. O. Clary, L. F. Reichardt, y J. V. Priestley. 1995. «Immunocytochemical Localization of trkA Receptors in Chemically Identified Subgroups of Adult Rat Sensory Neurons». *The European Journal of Neuroscience* 7(7):1484-94. doi: 10.1111/j.1460-9568.1995.tb01143.x.
- Balachandar, Arjun, y Steven A. Prescott. 2018. «Origin of Heterogeneous Spiking Patterns from Continuously Distributed Ion Channel Densities: A Computational Study in Spinal Dorsal Horn Neurons». *The Journal of Physiology* 596(9):1681-97. doi: 10.1113/JP275240.
- Balasubramanyan, Sridhar, Patrick L. Stemkowski, Martin J. Stebbing, y Peter A. Smith. 2006. «Sciatic Chronic Constriction Injury Produces Cell-Type-Specific Changes in the Electrophysiological Properties of Rat Substantia Gelatinosa Neurons». *Journal of Neurophysiology* 96(2):579-90. doi: 10.1152/jn.00087.2006.
- Bandell, Michael, Gina M. Story, Sun Wook Hwang, Veena Viswanath, Samer R. Eid, Matt J. Petrus, Taryn J. Earley, y Ardem Patapoutian. 2004. «Noxious Cold Ion Channel TRPA1 Is Activated by Pungent Compounds and Bradykinin». *Neuron* 41(6):849-57. doi: 10.1016/s0896-6273(04)00150-3.
- Barabas, Marie E., Elena A. Kossyreva, y Cheryl L. Stucky. 2012. «TRPA1 Is Functionally Expressed Primarily by IB4-Binding, Non-Peptidergic Mouse and Rat Sensory Neurons». *PLoS ONE* 7(10):e47988. doi: 10.1371/journal.pone.0047988.
- Barabas, Marie E., y Cheryl L. Stucky. 2013. «TRPV1, but Not TRPA1, in Primary Sensory Neurons Contributes to Cutaneous Incision-Mediated Hypersensitivity». *Molecular Pain* 9:9. doi: 10.1186/1744-8069-9-9.

- Baranauskas, Gytis, Tatiana Tkatch, Keiichi Nagata, Jay Z. Yeh, y D. James Surmeier. 2003. «Kv3.4 Subunits Enhance the Repolarizing Efficiency of Kv3.1 Channels in Fast-Spiking Neurons». *Nature Neuroscience* 6(3):258-66. doi: 10.1038/nn1019.
- Basbaum, Allan I., Diana M. Bautista, Grégory Scherrer, y David Julius. 2009. «Cellular and Molecular Mechanisms of Pain». *Cell* 139(2):267-84. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028.
- Bautista, Diana M., Sven-Eric Jordt, Tetsuro Nikai, Pamela R. Tsuruda, Andrew J. Read, Jeannie Poblete, Ebenezer N. Yamoah, Allan I. Basbaum, y David Julius. 2006. «TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents». *Cell* 124(6):1269-82. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.023.
- Bautista, Diana M., Pouya Movahed, Andrew Hinman, Helena E. Axelsson, Olov Sterner, Edward D. Högestätt, David Julius, Sven-Eric Jordt, y Peter M. Zygmunt. 2005. «Pungent Products from Garlic Activate the Sensory Ion Channel TRPA1». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(34):12248-52. doi: 10.1073/pnas.0505356102.
- Bautista, Diana M., Maurizio Pellegrino, y Makoto Tsunozaki. 2013. «TRPA1: A Gatekeeper for Inflammation». *Annual review of physiology* 75:181-200. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183811.
- Beaudry, Hélène, Ihab Daou, Ariel R. Ase, Alfredo Ribeiro-da-Silva, y Philippe Séguéla. 2017. «Distinct Behavioral Responses Evoked by Selective Optogenetic Stimulation of the Major TRPV1+ and MrgD+ Subsets of C-Fibers». *Pain* 158(12):2329-39. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001016.
- Bennett, D. L., S. Averill, D. O. Clary, J. V. Priestley, y S. B. McMahon. 1996. «Postnatal Changes in the Expression of the trkA High-Affinity NGF Receptor in Primary Sensory Neurons». *The European Journal of Neuroscience* 8(10):2204-8. doi: 10.1111/j.1460-9568.1996.tb00742.x.
- Bennett, Jeanette M., Glenn Reeves, George E. Billman, y Joachim P. Sturmborg. 2018. «Inflammation–Nature’s Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing “the Epidemic” of Chronic Diseases». *Frontiers in Medicine* 5.
- Bhuiyan, Shamsuddin A., Mengyi Xu, Lite Yang, Evangelia Semizoglou, Parth Bhatia, Katerina I. Pantaleo, Ivan Tochitsky, Aakanksha Jain, Burcu Erdogan, Steven Blair, Victor Cat, Juliet M. Mwirigi, Ishwarya Sankaranarayanan, Diana Tavares-Ferreira, Ursula Green, Lisa A. McIlvried, Bryan A. Copits, Zachariah Bertels, John S. Del Rosario, Allie J. Widman, Richard A. Slivicki, Jiwon Yi, Reza Sharif-Naeini, Clifford J. Woolf, Jochen K. Lennerz, Jessica L. Whited, Theodore J. Price, Robert W., y William Renthall. 2024. «Harmonized cross-species cell atlases of trigeminal and dorsal root ganglia». *Science Advances* 10(25):eadj9173. doi: 10.1126/sciadv.adj9173.
- Billiau, Alfons, y Patrick Matthys. 2001. «Modes of Action of Freund’s Adjuvants in Experimental Models of Autoimmune Diseases». *Journal of Leukocyte Biology* 70(6):849-60. doi: 10.1189/jlb.70.6.849.
- Bogen, Oliver, Olaf Bender, Jana Löwe, Wolfgang Blenau, Beatrice Thevis, Wolfgang Schröder, Richard U. Margolis, Jon D. Levine, y Ferdinand Hucho. 2015. «Neuronally produced

- versican V2 renders C-fiber nociceptors IB4-positive». *Journal of neurochemistry* 134(1):147-55. doi: 10.1111/jnc.13113.
- Bonin, Robert P., y Yves De Koninck. 2014. «A Spinal Analog of Memory Reconsolidation Enables Reversal of Hyperalgesia». *Nature Neuroscience* 17(8):1043-45. doi: 10.1038/nn.3758.
- Bourinet, Emmanuel, Christophe Altier, Michael E. Hildebrand, Tuan Trang, Michael W. Salter, y Gerald W. Zamponi. 2014. «Calcium-Permeable Ion Channels in Pain Signaling». *Physiological Reviews* 94(1):81-140. doi: 10.1152/physrev.00023.2013.
- Boyden, Edward S., Feng Zhang, Ernst Bamberg, Georg Nagel, y Karl Deisseroth. 2005. «Millisecond-Timescale, Genetically Targeted Optical Control of Neural Activity». *Nature Neuroscience* 8(9):1263-68. doi: 10.1038/nn1525.
- Boyle, Kieran A., Mark A. Gradwell, Toshiharu Yasaka, Allen C. Dickie, Erika Polgár, Robert P. Ganley, Desmond P. H. Orr, Masahiko Watanabe, Victoria E. Abaira, Emily D. Kuehn, Amanda L. Zimmerman, David D. Ginty, Robert J. Callister, Brett A. Graham, y David I. Hughes. 2019. «Defining a Spinal Microcircuit That Gates Myelinated Afferent Input: Implications for Tactile Allodynia». *Cell Reports* 28(2):526-540.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.06.040.
- Brain, S. D., y T. J. Williams. 1989. «Interactions between the Tachykinins and Calcitonin Gene-Related Peptide Lead to the Modulation of Oedema Formation and Blood Flow in Rat Skin». *British Journal of Pharmacology* 97(1):77-82. doi: 10.1111/j.1476-5381.1989.tb11926.x.
- Braz, João, Carlos Solorzano, Xidao Wang, y Allan I. Basbaum. 2014. «Transmitting Pain and Itch Messages: A Contemporary View of the Spinal Cord Circuits That Generate Gate Control». *Neuron* 82(3):522-36. doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.018.
- Breese, Nicole M., Annette C. George, Laura E. Pauers, y Cheryl L. Stucky. 2005. «Peripheral Inflammation Selectively Increases TRPV1 Function in IB4-Positive Sensory Neurons from Adult Mouse». *Pain* 115(1-2):37-49. doi: 10.1016/j.pain.2005.02.010.
- Brewster, Monique S. J., y Rachele Gaudet. 2015. «How the TRPA1 Receptor Transmits Painful Stimuli: Inner Workings Revealed by Electron Cryomicroscopy». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 37(11):1184-92. doi: 10.1002/bies.201500085.
- Brierley, Stuart M., Patrick A. Hughes, Amanda J. Page, Kelvin Y. Kwan, Christopher M. Martin, Tracey A. O'Donnell, Nicole J. Cooper, Andrea M. Harrington, Birgit Adam, Tobias Liebrechts, Gerald Holtmann, David P. Corey, Grigori Y. Rychkov, y L. Ashley Blackshaw. 2009. «The Ion Channel TRPA1 Is Required for Normal Mechanosensation and Is Modulated by Algesic Stimuli». *Gastroenterology* 137(6):2084-2095.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2009.07.048.
- Brown, Eric V., Ayma F. Malik, Elizabeth R. Moese, Abigail F. McElroy, y Angelo C. Lepore. 2022. «Differential Activation of Pain Circuitry Neuron Populations in a Mouse Model of Spinal Cord Injury-Induced Neuropathic Pain». *The Journal of Neuroscience* 42(15):3271-89. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1596-21.2022.
- Browne, Tyler J., Mark A. Gradwell, Jacqueline A. Iredale, Jessica F. Madden, Robert J. Callister, David I. Hughes, Christopher V. Dayas, y Brett A. Graham. 2020. «Transgenic Cross-

- Referencing of Inhibitory and Excitatory Interneuron Populations to Dissect Neuronal Heterogeneity in the Dorsal Horn». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 13:32. doi: 10.3389/fnmol.2020.00032.
- Bullitt, E. 1990. «Expression of C-Fos-like Protein as a Marker for Neuronal Activity Following Noxious Stimulation in the Rat». *The Journal of Comparative Neurology* 296(4):517-30. doi: 10.1002/cne.902960402.
- Bullitt, Elizabeth, Chong Lam Lee, Alan R. Light, y Helen Willcockson. 1992. «The Effect of Stimulus Duration on Noxious-Stimulus Induced c-Fos Expression in the Rodent Spinal Cord». *Brain Research* 580(1):172-79. doi: 10.1016/0006-8993(92)90941-2.
- Cameron, Darren, Erika Polgár, Maria Gutierrez-Mecinas, Maria Gomez-Lima, Masahiko Watanabe, y Andrew J. Todd. 2015. «The Organisation of Spinoparabrachial Neurons in the Mouse». *PAIN* 156(10):2061. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000270.
- del Camino, Donato, Sarah Murphy, Melissa Heiry, Lee B. Barrett, Taryn J. Earley, Colby A. Cook, Matt J. Petrus, Michael Zhao, Marc D'Amours, Nate Deering, Gary J. Brenner, Michael Costigan, Neil J. Hayward, Jayhong A. Chong, Christopher M. Fanger, Clifford J. Woolf, Ardem Patapoutian, y Magdalene M. Moran. 2010. «TRPA1 Contributes to Cold Hypersensitivity». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30(45):15165-74. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2580-10.2010.
- Campero, M., J. Serra, H. Bostock, y J. L. Ochoa. 2001. «Slowly Conducting Afferents Activated by Innocuous Low Temperature in Human Skin». *Journal of Physiology* 535(3):855-65. doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.t01-1-00855.x.
- Caspani, Ombretta, Sandra Zurborg, Dominika Labuz, y Paul A. Heppenstall. 2009. «The Contribution of TRPM8 and TRPA1 Channels to Cold Allodynia and Neuropathic Pain». *PLOS ONE* 4(10):e7383. doi: 10.1371/journal.pone.0007383.
- Caterina, M. J., A. Leffler, A. B. Malmberg, W. J. Martin, J. Trafton, K. R. Petersen-Zeit, M. Koltzenburg, A. I. Basbaum, y D. Julius. 2000. «Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor». *Science (New York, N.Y.)* 288(5464):306-13. doi: 10.1126/science.288.5464.306.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine, y D. Julius. 1997. «The Capsaicin Receptor: A Heat-Activated Ion Channel in the Pain Pathway». *Nature* 389(6653):816-24. doi: 10.1038/39807.
- Cavanaugh, Daniel J., Alexander T. Chesler, Joao M. Bráz, Nirao M. Shah, David Julius, y Allan I. Basbaum. 2011. «Restriction of Transient Receptor Potential Vanilloid-1 to the Peptidergic Subset of Primary Afferent Neurons Follows Its Developmental Downregulation in Nonpeptidergic Neurons». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31(28):10119-27. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1299-11.2011.
- Cavanaugh, Daniel J., Hyosang Lee, Liching Lo, Shannon D. Shields, Mark J. Zylka, Allan I. Basbaum, y David J. Anderson. 2009. «Distinct Subsets of Unmyelinated Primary Sensory Fibers Mediate Behavioral Responses to Noxious Thermal and Mechanical Stimuli». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(22):9075-80. doi: 10.1073/pnas.0901507106.

- Chattopadhyaya, Bidisha, Graziella Di Cristo, Hiroyuki Higashiyama, Graham W. Knott, Sandra J. Kuhlman, Egbert Welker, y Z. Josh Huang. 2004. «Experience and Activity-Dependent Maturation of Perisomatic GABAergic Innervation in Primary Visual Cortex during a Postnatal Critical Period». *The Journal of Neuroscience* 24(43):9598-9611. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1851-04.2004.
- Chen, Jinjun, Lingyong Li, Shao-Rui Chen, Hong Chen, Jing-Dun Xie, Rita E. Sirrieh, David M. MacLean, Yuhao Zhang, Meng-Hua Zhou, Vasanthi Jayaraman, y Hui-Lin Pan. 2018. «The A2δ-1-NMDA Receptor Complex Is Critically Involved in Neuropathic Pain Development and Gabapentin Therapeutic Actions». *Cell Reports* 22(9):2307-21. doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.021.
- Chen, Yong, Michael K. Boettger, Andreas Reif, Angelika Schmitt, Nurcan Uçeyler, y Claudia Sommer. 2010. «Nitric Oxide Synthase Modulates CFA-Induced Thermal Hyperalgesia through Cytokine Regulation in Mice». *Molecular Pain* 6:13. doi: 10.1186/1744-8069-6-13.
- Chisholm, Kim I., Laure Lo Re, Erika Polgár, Maria Gutierrez-Mecinas, Andrew J. Todd, y Stephen B. McMahon. 2021. «Encoding of Cutaneous Stimuli by Lamina I Projection Neurons». *Pain* 162(9):2405-17. doi: 10.1097/j.pain.0000000000002226.
- Cho, Hawon, Young Duk Yang, Jesun Lee, Byeongjoon Lee, Tahnbee Kim, Yongwoo Jang, Seung Keun Back, Heung Sik Na, Brian D. Harfe, Fan Wang, Ramin Raouf, John N. Wood, y Uhtaek Oh. 2012. «The Calcium-Activated Chloride Channel Anoctamin 1 Acts as a Heat Sensor in Nociceptive Neurons». *Nature Neuroscience* 15(7):1015-21. doi: 10.1038/nn.3111.
- Choi, Seungwon, Junichi Hachisuka, Matthew A. Brett, Alexandra R. Magee, Yu Omori, Noor-ul-Aine Iqbal, Dawei Zhang, Michelle M. DeLisle, Rachel L. Wolfson, Ling Bai, Celine Santiago, Shiaoqing Gong, Martyn Goulding, Nathaniel Heintz, H. Richard Koerber, Sarah E. Ross, y David D. Ginty. 2020. «Parallel Ascending Spinal Pathways for Affective Touch and Pain». *Nature* 587(7833):258-63. doi: 10.1038/s41586-020-2860-1.
- Christensen, Amelia J., Shrivats M. Iyer, Amaury François, Saurabh Vyas, Charu Ramakrishnan, Sam Vesuna, Karl Deisseroth, Grégory Scherrer, y Scott L. Delp. 2016. «In Vivo Interrogation of Spinal Mechanosensory Circuits». *Cell Reports* 17(6):1699-1710. doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.010.
- Chuang, H. H., E. D. Prescott, H. Kong, S. Shields, S. E. Jordt, A. I. Basbaum, M. V. Chao, y D. Julius. 2001. «Bradykinin and Nerve Growth Factor Release the Capsaicin Receptor from PtdIns(4,5)P2-Mediated Inhibition». *Nature* 411(6840):957-62. doi: 10.1038/35082088.
- Clancy, B., y L. J. Cauler. 1998. «Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride». *Journal of Neuroscience Methods* 83(2):97-102. doi: 10.1016/S0165-0270(98)00066-1.
- Clapham, David E. 2003. *TRP channels as cellular sensors*.
- Clements, J. D., y J. M. Bekkers. 1997. «Detection of Spontaneous Synaptic Events with an Optimally Scaled Template». *Biophysical Journal* 73(1):220-29. doi: 10.1016/S0006-3495(97)78062-7.

- Cobos, Enrique J., Nader Ghasemlou, Dionéia Araldi, David Segal, Kelly Duong, y Clifford J. Woolf. 2012. «Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: A nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia». *Pain* 153(4):876-84. doi: 10.1016/j.pain.2012.01.016.
- Cohen, Jonathan A., Tara N. Edwards, Andrew W. Liu, Toshiro Hirai, Marsha Ritter Jones, Jianing Wu, Yao Li, Shiqun Zhang, Jonhan Ho, Brian M. Davis, Kathryn M. Albers, y Daniel H. Kaplan. 2019. «Cutaneous TRPV1+ Neurons Trigger Protective Innate Type-17 Anticipatory Immunity». *Cell* 178(4):919-932.e14. doi: 10.1016/j.cell.2019.06.022.
- Corder, Gregory, Biafra Ahanonu, Benjamin F. Grewe, Dong Wang, Mark J. Schnitzer, y Grégory Scherrer. 2019. «An Amygdalar Neural Ensemble That Encodes the Unpleasantness of Pain». *Science (New York, N.Y.)* 363(6424):276-81. doi: 10.1126/science.aap8586.
- Corder, Gregory, Vivianne L. Tawfik, Dong Wang, Elizabeth I. Sypek, Sarah A. Low, Jasmine R. Dickinson, Chaudy Sotoudeh, J. David Clark, Ben A. Barres, Christopher J. Bohlen, y Grégory Scherrer. 2017. «Loss of μ -opioid receptor signaling in nociceptors, and not spinal microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesic efficacy». *Nature medicine* 23(2):164-73. doi: 10.1038/nm.4262.
- Cordero-Morales, Julio F., Elena O. Gracheva, y David Julius. 2011. «Cytoplasmic Ankyrin Repeats of Transient Receptor Potential A1 (TRPA1) Dictate Sensitivity to Thermal and Chemical Stimuli». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(46):E1184-1191. doi: 10.1073/pnas.1114124108.
- Corey, D. P., y A. J. Hudspeth. 1979. «Response Latency of Vertebrate Hair Cells». *Biophysical Journal* 26(3):499-506. doi: 10.1016/S0006-3495(79)85267-4.
- Cosens, D. J., y A. Manning. 1969. «Abnormal Electroretinogram from a Drosophila Mutant». *Nature* 224(5216):285-87. doi: 10.1038/224285a0.
- da Costa, Diogo Santos M., Flavia Carla Meotti, Edinéia Lemos Andrade, Paulo César Leal, Emerson Marcelo Motta, y João B. Calixto. 2010. «The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation». *Pain* 148(3):431-37. doi: 10.1016/j.pain.2009.12.002.
- Costigan, Michael, Joachim Scholz, y Clifford J. Woolf. 2009. «Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage». *Annual Review of Neuroscience* 32(1):1-32. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135531.
- Cruz-Mendoza, Fernando, Fernando Jauregui-Huerta, Adriana Aguilar-Delgadillo, Joaquín García-Estrada, y Sonia Luquin. 2022. «Immediate Early Gene c-fos in the Brain: Focus on Glial Cells». *Brain Sciences* 12(6):687. doi: 10.3390/brainsci12060687.
- Daou, Ihab, Alexander H. Tuttle, Geraldine Longo, Jeffrey S. Wieskopf, Robert P. Bonin, Ariel R. Ase, John N. Wood, Yves De Koninck, Alfredo Ribeiro-da-Silva, Jeffrey S. Mogil, y Philippe Séguéla. 2013. «Remote Optogenetic Activation and Sensitization of Pain Pathways in Freely Moving Mice». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33(47):18631-40. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2424-13.2013.
- Das Gupta, Rebecca Rani, Louis Scheurer, Pawel Pelczar, Hendrik Wildner, y Hanns Ulrich Zeilhofer. 2021. «Neuron-Specific Spinal Cord Translatomes Reveal a Neuropeptide

- Code for Mouse Dorsal Horn Excitatory Neurons». *Scientific Reports* 11(1):5232. doi: 10.1038/s41598-021-84667-y.
- Davis, J. B., J. Gray, M. J. Gunthorpe, J. P. Hatcher, P. T. Davey, P. Overend, M. H. Harries, J. Latcham, C. Clapham, K. Atkinson, S. A. Hughes, K. Rance, E. Grau, A. J. Harper, P. L. Pugh, D. C. Rogers, S. Bingham, A. Randall, y S. A. Sheardown. 2000. «Vanilloid Receptor-1 Is Essential for Inflammatory Thermal Hyperalgesia». *Nature* 405(6783):183-87. doi: 10.1038/35012076.
- De Logu, Francesco, Romina Nassini, Serena Materazzi, Muryel Carvalho Gonçalves, Daniele Nosi, Duccio Rossi Degl'Innocenti, Ilaria M. Marone, Juliano Ferreira, Simone Li Puma, Silvia Benemei, Gabriela Trevisan, Daniel Souza Monteiro de Araújo, Riccardo Patacchini, Nigel W. Bunnett, y Pierangelo Geppetti. 2017. «Schwann Cell TRPA1 Mediates Neuroinflammation That Sustains Macrophage-Dependent Neuropathic Pain in Mice». *Nature Communications* 8(1):1887. doi: 10.1038/s41467-017-01739-2.
- DeNardo, Laura A., Cindy D. Liu, William E. Allen, Eliza L. Adams, Drew Friedmann, Lisa Fu, Casey J. Guenthner, Marc Tessier-Lavigne, y Liqun Luo. 2019. «Temporal evolution of cortical ensembles promoting remote memory retrieval». *Nature Neuroscience* 22(3):460-69. doi: 10.1038/s41593-018-0318-7.
- Deng, Xiaolin, Bruce Ladenheim, Li-I. Tsao, y Jean Lud Cadet. 1999. «Null Mutation of c-fos Causes Exacerbation of Methamphetamine-Induced Neurotoxicity». *The Journal of Neuroscience* 19(22):10107-15. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-22-10107.1999.
- Dickie, Allen C., Andrew M. Bell, Noboru Iwagaki, Erika Polgár, Maria Gutierrez-Mecinas, Rosalind Kelly, Heather Lyon, Kirsten Turnbull, Steven J. West, Alexander Etlin, Joao Braz, Masahiko Watanabe, David L. H. Bennett, Allan I. Basbaum, John S. Riddell, y Andrew J. Todd. 2019. «Morphological and Functional Properties Distinguish the Substance P and Gastrin-Releasing Peptide Subsets of Excitatory Interneuron in the Spinal Cord Dorsal Horn». *PAIN* 160(2):442. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001406.
- Dirajlal, Sahera, Laura E. Pauers, y Cheryl L. Stucky. 2003. «Differential Response Properties of IB4-Positive and -Negative Unmyelinated Sensory Neurons to Protons and Capsaicin». *Journal of Neurophysiology* 89(1):513-24. doi: 10.1152/jn.00371.2002.
- Doyle, C. A., y S. P. Hunt. 1999. «Substance p Receptor (Neurokinin-1)-Expressing Neurons in Lamina I of the Spinal Cord Encode for the Intensity of Noxious Stimulation: A c-Fos Study in Rat». *Neuroscience* 89(1):17-28. doi: 10.1016/S0306-4522(98)00276-0.
- Duan, Bo, Longzhen Cheng, Steeve Bourane, Olivier Britz, Christopher Padilla, Lidia Garcia-Campany, Michael Krashes, Wendy Knowlton, Tomoko Velasquez, Xiangyu Ren, Sarah Ross, Bradford B. Lowell, Yun Wang, Martyn Goulding, y Qiufu Ma. 2014. «Identification of Spinal Circuits Transmitting and Gating Mechanical Pain». *Cell* 159(6):1417-32. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.003.
- Duzhyy, Dmytro E., Nana V. Voitenko, y Pavel V. Belan. 2021. «Peripheral Inflammation Results in Increased Excitability of Capsaicin-Insensitive Nociceptive DRG Neurons Mediated by Upregulation of ASICs and Voltage-Gated Ion Channels». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 15.
- Earley, Scott. 2012. «TRPA1 channels in the vasculature». *British Journal of Pharmacology* 167(1):13-22. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02018.x.

- Eid, Samer R., Eric D. Crown, Eric L. Moore, Hongyu A. Liang, Kar-Chan Choong, Shelley Dima, Darrell A. Henze, Stefanie A. Kane, y Mark O. Urban. 2008. «HC-030031, a TRPA1 Selective Antagonist, Attenuates Inflammatory- and Neuropathy-Induced Mechanical Hypersensitivity». *Molecular Pain* 4:48. doi: 10.1186/1744-8069-4-48.
- Elias, Leah J., Isabella K. Succi, Melanie D. Schaffler, William Foster, Mark A. Gradwell, Manon Bohic, Akira Fushiki, Aman Upadhyay, Lindsay L. Ejoh, Ryan Schwark, Rachel Frazer, Brittany Bistis, Jessica E. Burke, Victoria Saltz, Jared E. Boyce, Anissa Jhumka, Rui M. Costa, Victoria E. Abaira, y Ishmail Abdus-Saboor. 2023. «Touch Neurons Underlying Dopaminergic Pleasurable Touch and Sexual Receptivity». *Cell* 186(3):577-590.e16. doi: 10.1016/j.cell.2022.12.034.
- Erisir, A., D. Lau, B. Rudy, y C. S. Leonard. 1999. «Function of Specific K(+) Channels in Sustained High-Frequency Firing of Fast-Spiking Neocortical Interneurons». *Journal of Neurophysiology* 82(5):2476-89. doi: 10.1152/jn.1999.82.5.2476.
- Erofeev, Alexander, Evgenii Gerasimov, Anastasia Lavrova, Anastasia Bolshakova, Eugene Postnikov, Ilya Bezprozvanny, y Olga L. Vlasova. 2019. «Light Stimulation Parameters Determine Neuron Dynamic Characteristics». *Applied Sciences* 9(18):3673. doi: 10.3390/app9183673.
- Eun, Su-Yong, Yun Hwa Hong, Eun Hae Kim, Hojeong Jeon, Young Ho Suh, Ji Eun Lee, Chulman Jo, Sangmee Ahn Jo, y Jun Kim. 2004. «Glutamate Receptor-Mediated Regulation of c-Fos Expression in Cultured Microglia». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325(1):320-27. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.10.035.
- Fajardo, O., V. Meseguer, C. Belmonte, y F. Viana. 2008. «TRPA1 Channels Mediate Cold Temperature Sensing in Mammalian Vagal Sensory Neurons: Pharmacological and Genetic Evidence». *Journal of Neuroscience* 28(31):7863-75. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1696-08.2008.
- Feil, R., J. Brocard, B. Mascres, M. LeMeur, D. Metzger, y P. Chambon. 1996. «Ligand-Activated Site-Specific Recombination in Mice». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(20):10887-90. doi: 10.1073/pnas.93.20.10887.
- Fernandes, E. S., M. A. Fernandes, y J. E. Keeble. 2012. «The Functions of TRPA1 and TRPV1: Moving Away from Sensory Nerves». *British Journal of Pharmacology* 166(2):510-21. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01851.x.
- Fernández-Trillo, Jorge, Danny Florez-Paz, Almudena Íñigo-Portugués, Omar González-González, Ana Gómez Del Campo, Alejandro González, Félix Viana, Carlos Belmonte, y Ana Gomis. 2020. «Piezo2 Mediates Low-Threshold Mechanically Evoked Pain in the Cornea». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 40(47):8976-93. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0247-20.2020.
- François, Amaury, Sarah A. Low, Elizabeth I. Sypek, Amelia J. Christensen, Chaudy Sotoudeh, Kevin T. Beier, Charu Ramakrishnan, Kimberly D. Ritola, Reza Sharif-Naeini, Karl Deisseroth, Scott L. Delp, Robert C. Malenka, Liqun Luo, Adam W. Hantman, y Grégory Scherrer. 2017. «A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins». *Neuron* 93(4):822-839.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2017.01.008.

- Freund, Jules, J. Casals, y Elizabeth Page Hosmer. 1937. «Sensitization and Antibody Formation after Injection of Tubercle Bacilli and Paraffin Oil.» *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 37(3):509-13. doi: 10.3181/00379727-37-9625.
- Furness, John B., y Nadine Clerc. 2000. «Chapter 11 - Responses of Afferent Neurons to the Contents of the Digestive Tract, and Their Relation to Endocrine and Immune Responses». Pp. 159-72 en *Progress in Brain Research*. Vol. 122, *The Biological Basis for Mind Body Interactions*, editado por E. A. Mayer y C. B. Saper. Elsevier.
- Gao, Yong-Jing, y Ru-Rong Ji. 2009. «c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury?» *The open pain journal* 2:11-17. doi: 10.2174/1876386300902010011.
- Gatto, Graziana, Steeve Bourane, Xiangyu Ren, Stefania Di Costanzo, Peter K. Fenton, Priyabrata Halder, Rebecca P. Seal, y Martyn D. Goulding. 2021. «A Functional Topographic Map for Spinal Sensorimotor Reflexes». *Neuron* 109(1):91-104.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2020.10.003.
- Gaudet, Rachelle. 2008. «A Primer on Ankyrin Repeat Function in TRP Channels and Beyond». *Molecular bioSystems* 4(5):372-79. doi: 10.1039/b801481g.
- Gerhold, K. A., y D. M. Bautista. 2008. «TRPA1: irritant detector of the airways». *The Journal of Physiology* 586(Pt 14):3303. doi: 10.1113/jphysiol.2008.158030.
- Gers-Barlag, Katharina, Pablo Hernández-Ortego, Eva Quintero, y Félix Viana. 2021. «Differential Mechanisms of Cold Sensitivity in Mouse Trigeminal and Vagal Ganglion Neurons». 2021.08.05.455314.
- Godement, Pierre, Jens Vanselow, Solon Thanos, y Friedrich Bonhoeffer. 1987. «A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue». *Development* 101(4):697-713. doi: 10.1242/dev.101.4.697.
- Gouin, Olivier, Killian L'Herondelle, Nicolas Lebonvallet, Christelle Le Gall-Ianotto, Mehdi Sakka, Virginie Buhé, Emmanuelle Plée-Gautier, Jean-Luc Carré, Luc Lefeuve, Laurent Misery, y Raphaelle Le Garrec. 2017. «TRPV1 and TRPA1 in Cutaneous Neurogenic and Chronic Inflammation: Pro-Inflammatory Response Induced by Their Activation and Their Sensitization». *Protein & Cell* 8(9):644-61. doi: 10.1007/s13238-017-0395-5.
- Gould, Harry J., John D. England, R. Denis Soignier, Porter Nolan, Lerna D. Minor, Z. P. Liu, S. Rock Levinson, y Dennis Paul. 2004. «Ibuprofen Blocks Changes in Na v 1.7 and 1.8 Sodium Channels Associated with Complete Freund's Adjuvant-Induced Inflammation in Rat». *The Journal of Pain* 5(5):270-80. doi: 10.1016/j.jpain.2004.04.005.
- Graham, Brett A., y David I. Hughes. 2020. «Defining Populations of Dorsal Horn Interneurons». *Pain* 161(11):2434-36. doi: 10.1097/j.pain.0000000000002067.
- Grant, Gunnar, Jan Arvidsson, Brita Robertson, y Jan Ygge. 1979. «Transganglionic Transport of Horseradish Peroxidase in Primary Sensory Neurons». *Neuroscience Letters* 12(1):23-28. doi: 10.1016/0304-3940(79)91474-5.
- Grudt, T. J., y E. R. Perl. 2002. «Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn». *The Journal of Physiology* 540(Pt 1):189-207. doi: 10.1113/jphysiol.2001.012890.

- Gryniewicz, G., M. Poenie, y R. Y. Tsien. 1985. «A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties.» *Journal of Biological Chemistry* 260(6):3440-50. doi: 10.1016/S0021-9258(19)83641-4.
- Gu, Nan, Min-Hee Yi, Madhuvika Murugan, Manling Xie, Sebastian Parusel, Jiyun Peng, Ukpong B. Eyo, Christine L. Hunt, Hailong Dong, y Long-Jun Wu. 2022. «Spinal microglia contribute to sustained inflammatory pain via amplifying neuronal activity». *Molecular Brain* 15(1):86. doi: 10.1186/s13041-022-00970-3.
- Guenther, Casey J., Kazunari Miyamichi, Helen H. Yang, H. Craig Heller, y Liqun Luo. 2013. «Permanent genetic access to transiently active neurons via TRAP: Targeted recombination in active populations». *Neuron* 78(5):773-84. doi: 10.1016/j.neuron.2013.03.025.
- Gutierrez-Mecinas, Maria, Olivia Davis, Erika Polgár, Mahvish Shahzad, Keila Navarro-Batista, Takahiro Furuta, Masahiko Watanabe, David I. Hughes, y Andrew J. Todd. 2019. «Expression of Calretinin Among Different Neurochemical Classes of Interneuron in the Superficial Dorsal Horn of the Mouse Spinal Cord». *Neuroscience* 398:171-81. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.12.009.
- Hachisuka, Junichi, H. Richard Koerber, y Sarah E. Ross. 2020. «Selective-Cold Output through a Distinct Subset of Lamina I Spinoparabrachial Neurons». *Pain* 161(1):185-94. doi: 10.1097/j.pain.0000000000001710.
- Haines, Duane E., y Gregory A. Mihailoff. 2017. *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications E-Book: Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Hamad, Mohammad I. K., Martin Krause, y Petra Wahle. 2015. «Improving AM Ester Calcium Dye Loading Efficiency». *Journal of Neuroscience Methods* 240:48-60. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.11.010.
- Han, Qingjian, Di Liu, Marino Convertino, Zilong Wang, Changyu Jiang, Yong Ho Kim, Xin Luo, Xin Zhang, Andrea Nackley, Nikolay V. Dokholyan, y Ru-Rong Ji. 2018. «miRNA-711 Binds and Activates TRPA1 Extracellularly to Evoke Acute and Chronic Pruritus». *Neuron* 99(3):449-463.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2018.06.039.
- Han, Wenfei, y Ivan E. de Araujo. 2021. «Dissection and Surgical Approaches to the Mouse Jugular-Nodose Ganglia». *STAR Protocols* 2(2):100474. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100474.
- Hanani, Menachem, y David C. Spray. 2020. «Emerging Importance of Satellite Glia in Nervous System Function and Dysfunction». *Nature Reviews Neuroscience* 21(9):485-98. doi: 10.1038/s41583-020-0333-z.
- Hardie, Roger C., y Baruch Minke. 1992. «The Trp Gene Is Essential for a Light-Activated Ca²⁺ Channel in Drosophila Photoreceptors». *Neuron* 8(4):643-51. doi: 10.1016/0896-6273(92)90086-S.
- Harding, Erika K., Samuel Wanchi Fung, y Robert P. Bonin. 2020. «Insights Into Spinal Dorsal Horn Circuit Function and Dysfunction Using Optical Approaches». *Frontiers in Neural Circuits* 14. doi: 10.3389/fncir.2020.00031.

- Hargreaves, K., R. Dubner, F. Brown, C. Flores, y J. Joris. 1988. «A New and Sensitive Method for Measuring Thermal Nociception in Cutaneous Hyperalgesia». *Pain* 32(1):77-88. doi: 10.1016/0304-3959(88)90026-7.
- Häring, Martin, Amit Zeisel, Hannah Hochgerner, Puneet Rinwa, Jon E. T. Jakobsson, Peter Lönnerberg, Gioele La Manno, Nilesch Sharma, Lotta Borgius, Ole Kiehn, Malin C. Lagerström, Sten Linnarsson, y Patrik Ernfors. 2018. «Neuronal Atlas of the Dorsal Horn Defines Its Architecture and Links Sensory Input to Transcriptional Cell Types». *Nature Neuroscience* 21(6):869-80. doi: 10.1038/s41593-018-0141-1.
- Harrison, Megan, Aine O'Brien, Lucy Adams, Gary Cowin, Marc J. Ruitenberg, Gulgun Sengul, y Charles Watson. 2013. «Vertebral Landmarks for the Identification of Spinal Cord Segments in the Mouse». *NeuroImage* 68:22-29. doi: 10.1016/j.neuroimage.2012.11.048.
- Harvey, Robert J., Ulrike B. Depner, Heinz Wässle, Seifollah Ahmadi, Cornelia Heindl, Heiko Reinold, Trevor G. Smart, Kirsten Harvey, Burkhard Schütz, Osama M. Abo-Salem, Andreas Zimmer, Pierrick Poisbeau, Hans Welzl, David P. Wolfer, Heinrich Betz, Hanns Ulrich Zeilhofer, y Ulrike Müller. 2004. «GlyR $\alpha 3$: An Essential Target for Spinal PGE₂-Mediated Inflammatory Pain Sensitization». *Science* 304(5672):884-87. doi: 10.1126/science.1094925.
- von Hehn, Christian A., Ralf Baron, y Clifford J. Woolf. 2012. «Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms». *Neuron* 73(4):638-52. doi: 10.1016/j.neuron.2012.02.008.
- Heinke, Bernhard, Ruth Ruscheweyh, Liesbeth Forsthuber, Gabriele Wunderbaldinger, y Jürgen Sandkühler. 2004. «Physiological, Neurochemical and Morphological Properties of a Subgroup of GABAergic Spinal Lamina II Neurones Identified by Expression of Green Fluorescent Protein in Mice». *The Journal of Physiology* 560(Pt 1):249-66. doi: 10.1113/jphysiol.2004.070540.
- Heise, Claire, y Gulgun Kayalioglu. 2009. «Cytoarchitecture of the Spinal Cord». Pp. 64-93 en *The Spinal Cord*. Elsevier.
- Hernández-Ortego, Pablo, Remedios Torres-Montero, Elvira de la Peña, Félix Viana, y Jorge Fernández-Trillo. 2022. «Validation of Six Commercial Antibodies for the Detection of Heterologous and Endogenous TRPM8 Ion Channel Expression». *International Journal of Molecular Sciences* 23(24):16164. doi: 10.3390/ijms232416164.
- Herrera, Daniel G., y Harold A. Robertson. 1996. «Activation of C-Fos in the Brain». *Progress in Neurobiology* 50(2):83-107. doi: 10.1016/S0301-0082(96)00021-4.
- Hinman, Andrew, Huai-Hu Chuang, Diana M. Bautista, y David Julius. 2006. «TRP Channel Activation by Reversible Covalent Modification». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(51):19564-68. doi: 10.1073/pnas.0609598103.
- Hisanaga, Kinya, Stephen M. Sagar, Katy J. Hicks, Raymond A. Swanson, y Frank R. Sharp. 1990. «c-fos proto-oncogene expression in astrocytes associated with differentiation or proliferation but not depolarization». *Molecular Brain Research* 8(1):69-75. doi: 10.1016/0169-328X(90)90011-2.

- Hiyama, Haruka, Yuichi Yano, Kanako So, Satoshi Imai, Kazuki Nagayasu, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, y Shuji Kaneko. 2018. «TRPA1 Sensitization during Diabetic Vascular Impairment Contributes to Cold Hypersensitivity in a Mouse Model of Painful Diabetic Peripheral Neuropathy». *Molecular Pain* 14:1744806918789812. doi: 10.1177/1744806918789812.
- Hoffmann, T., K. Kistner, F. Miermeister, R. Winkelmann, J. Wittmann, M. J. M. Fischer, C. Weidner, y P. W. Reeh. 2013. «TRPA1 and TRPV1 Are Differentially Involved in Heat Nociception of Mice». *European Journal of Pain (United Kingdom)* 17(10):1472-82. doi: 10.1002/j.1532-2149.2013.00331.x.
- Hondoh, Aki, Yusuke Ishida, Shinya Ugawa, Takashi Ueda, Yasuhiro Shibata, Takahiro Yamada, Michiko Shikano, Shingo Murakami, y Shoichi Shimada. 2010. «Distinct Expression of Cold Receptors (TRPM8 and TRPA1) in the Rat Nodose-Petrosal Ganglion Complex». *Brain Research* 1319:60-69. doi: 10.1016/j.brainres.2010.01.016.
- Honig, M. G., y R. I. Hume. 1986. «Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures.» *Journal of Cell Biology* 103(1):171-87. doi: 10.1083/jcb.103.1.171.
- Hu, Hui-Juan, y Robert W. Gereau. 2011. «Metabotropic glutamate receptor 5 regulates excitability and Kv4.2-containing K⁺ channels primarily in excitatory neurons of the spinal dorsal horn». *Journal of Neurophysiology* 105(6):3010-21. doi: 10.1152/jn.01050.2010.
- Huang, Jing, Erika Polgár, Hans Jürgen Solinski, Santosh K. Mishra, Pang-Yen Tseng, Noboru Iwagaki, Kieran A. Boyle, Allen C. Dickie, Mette C. Kriegbaum, Hendrik Wildner, Hanns Ulrich Zeilhofer, Masahiko Watanabe, John S. Riddell, Andrew J. Todd, y Mark A. Hoon. 2018. «Circuit Dissection of the Role of Somatostatin in Itch and Pain». *Nature Neuroscience* 21(5):707-16. doi: 10.1038/s41593-018-0119-z.
- Huang, Susan M., Xiaoxin Li, YinYin Yu, Juan Wang, y Michael J. Caterina. 2011. «TRPV3 and TRPV4 Ion Channels Are Not Major Contributors to Mouse Heat Sensation». *Molecular Pain* 7:37. doi: 10.1186/1744-8069-7-37.
- Huang, Yuying, Shao Rui Chen, Hong Chen, y Hui Lin Pan. 2019. «Endogenous transient receptor potential ankyrin 1 and vanilloid 1 activity potentiates glutamatergic input to spinal lamina I neurons in inflammatory pain». *Journal of Neurochemistry* 149(3):381-98. doi: 10.1111/jnc.14677.
- Hughes, David I., y Andrew J. Todd. 2020. «Central Nervous System Targets: Inhibitory Interneurons in the Spinal Cord». *Neurotherapeutics* 17(3):874-85. doi: 10.1007/s13311-020-00936-0.
- Hunt, Stephen P., Adrian Pini, y Gerard Evan. 1987. «Induction of C-Fos-like Protein in Spinal Cord Neurons Following Sensory Stimulation». *Nature* 328(6131):632-34. doi: 10.1038/328632a0.
- Hwang, Richard Y., Nancy A. Stearns, y W. Daniel Tracey. 2012. «The Ankyrin Repeat Domain of the TRPA Protein Painless Is Important for Thermal Nociception but Not Mechanical Nociception». *PloS One* 7(1):e30090. doi: 10.1371/journal.pone.0030090.

- Ishizuka, Toru, Masaaki Kakuda, Rikita Araki, y Hiromu Yawo. 2006. «Kinetic Evaluation of Photosensitivity in Genetically Engineered Neurons Expressing Green Algae Light-Gated Channels». *Neuroscience Research* 54(2):85-94. doi: 10.1016/j.neures.2005.10.009.
- Jankowski, Michael P., Kristofer K. Rau, y H. Richard Koerber. 2017. «Cutaneous TRPM8-expressing sensory afferents are a small population of neurons with unique firing properties». *Physiological Reports* 5(7):e13234. doi: 10.14814/phy2.13234.
- Jaquemar, D., T. Schenker, y B. Trueb. 1999. «An Ankyrin-like Protein with Transmembrane Domains Is Specifically Lost after Oncogenic Transformation of Human Fibroblasts». *The Journal of Biological Chemistry* 274(11):7325-33. doi: 10.1074/jbc.274.11.7325.
- Jenkins, Skyler, y R. Shane Tubbs. 2021. «Chapter 11 - The Sciatic Nerve». Pp. 53-72 en *Surgical Anatomy of the Sacral Plexus and Its Branches*, editado por R. S. Tubbs, J. Iwanaga, M. Loukas, A. S. Dumont, y M. Angel reina. Elsevier.
- Ji, Ru-Rong, Tarek A. Samad, Shan-Xue Jin, Raymond Schmoll, y Clifford J. Woolf. 2002. «P38 MAPK Activation by NGF in Primary Sensory Neurons after Inflammation Increases TRPV1 Levels and Maintains Heat Hyperalgesia». *Neuron* 36(1):57-68. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00908-X.
- Jiang, Yuheng, y Antonius M. J. VanDongen. 2021. «Selective Increase of Correlated Activity in Arc-Positive Neurons after Chemically Induced Long-Term Potentiation in Cultured Hippocampal Neurons». *eNeuro* 8(6):ENEURO.0540-20.2021. doi: 10.1523/ENEURO.0540-20.2021.
- Jordt, Sven-Eric, Diana M. Bautista, Huai-Hu Chuang, David D. McKemy, Peter M. Zygmunt, Edward D. Högestätt, Ian D. Meng, y David Julius. 2004. «Mustard Oils and Cannabinoids Excite Sensory Nerve Fibres through the TRP Channel ANKTM1». *Nature* 427(6971):260-65. doi: 10.1038/nature02282.
- Joshi, Chaitanya R., Vinod Labhasetwar, y Anuja Ghorpade. 2017. «Destination Brain: The Past, Present, and Future of Therapeutic Gene Delivery». *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 12(1):51-83. doi: 10.1007/s11481-016-9724-3.
- Julius, D., y A. I. Basbaum. 2001. «Molecular Mechanisms of Nociception». *Nature* 413(6852):203-10. doi: 10.1038/35093019.
- Julius, David. 2013. «TRP Channels and Pain». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 29:355-84. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155833.
- Kandel, Eric R., John D. Koester, Sarah H. Mack, y Steven A. Siegelbaum. 2021. *Principles of Neural Science, Sixth Edition*. McGraw Hill Professional.
- Karashima, Yuji, Karel Talavera, Wouter Everaerts, Annelies Janssens, Kelvin Y. Kwan, Rudi Vennekens, Bernd Nilius, y Thomas Voets. 2009. «TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(4):1273-78. doi: 10.1073/pnas.0808487106.
- Katz, L. C., A. Burkhalter, y W. J. Dreyer. 1984. «Fluorescent Latex Microspheres as a Retrograde Neuronal Marker for in Vivo and in Vitro Studies of Visual Cortex». *Nature* 310(5977):498-500. doi: 10.1038/310498a0.

- Kemplay, S. K., y K. E. Webster. 1986. «A Qualitative and Quantitative Analysis of the Distributions of Cells in the Spinal Cord and Spinomedullary Junction Projecting to the Thalamus of the Rat». *Neuroscience* 17(3):769-89. doi: 10.1016/0306-4522(86)90044-8.
- Kentish, Stephen J., Claudine L. Frisby, Stamatiki Kritas, Hui Li, George Hatzinikolas, Tracey A. O'Donnell, Gary A. Wittert, y Amanda J. Page. 2015. «TRPV1 Channels and Gastric Vagal Afferent Signalling in Lean and High Fat Diet Induced Obese Mice». *PLOS ONE* 10(8):e0135892. doi: 10.1371/journal.pone.0135892.
- Kerschensteiner, Martin, Martin E. Schwab, Jeff W. Lichtman, y Thomas Misgeld. 2005. «In Vivo Imaging of Axonal Degeneration and Regeneration in the Injured Spinal Cord». *Nature Medicine* 11(5):572-77. doi: 10.1038/nm1229.
- Kheradpezhough, Ehsan, Julian M. C. Choy, Vincent R. Daria, y Ehsan Arabzadeh. 2017. «TRPA1 expression and its functional activation in rodent cortex». *Open Biology* 7(4). doi: 10.1098/rsob.160314.
- Kim, Yu Shin, Michael Anderson, Kyoungsook Park, Qin Zheng, Amit Agarwal, Catherine Gong, Saijilafu, LeAnne Young, Shaoqiu He, Pamela Colleen LaVinka, Fengquan Zhou, Dwight Bergles, Menachem Hanani, Yun Guan, David C. Spray, y Xinzhong Dong. 2016. «Coupled Activation of Primary Sensory Neurons Contributes to Chronic Pain». *Neuron* 91(5):1085-96. doi: 10.1016/j.neuron.2016.07.044.
- Kim, Yun Sook, Jae Youn Son, Tae Heon Kim, Sang Kyoo Paik, Yi Dai, Koichi Noguchi, Dong Kuk Ahn, y Yong Chul Bae. 2010. «Expression of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) in the Rat Trigeminal Sensory Afferents and Spinal Dorsal Horn: Expression of TRPA1 in the Brainstem and Dorsal Horn». *Journal of Comparative Neurology* 518(5):687-98. doi: 10.1002/cne.22238.
- Koch, Stephanie C., David Acton, y Martyn Goulding. 2018. «Spinal Circuits for Touch, Pain, and Itch». *Annual Review of Physiology* 80(1):189-217. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034303.
- Kondo, T., K. Obata, K. Miyoshi, J. Sakurai, J. Tanaka, H. Miwa, y K. Noguchi. 2009. «Transient Receptor Potential A1 Mediates Gastric Distention-Induced Visceral Pain in Rats». *Gut* 58(10):1342-52. doi: 10.1136/gut.2008.175901.
- Kopach, Olga, Yulia Dobropolska, Pavel Belan, y Nana Voitenko. 2023. «Ca²⁺-Permeable AMPA Receptors Contribute to Changed Dorsal Horn Neuronal Firing and Inflammatory Pain». *International Journal of Molecular Sciences* 24(3):2341. doi: 10.3390/ijms24032341.
- Kopach, Olga, Sheng-Chin Kao, Ronald S. Petralia, Pavel Belan, Yuan-Xiang Tao, y Nana Voitenko. 2011. «Inflammation Alters Trafficking of Extrasynaptic AMPA Receptors in Tonically Firing Lamina II Neurons of the Rat Spinal Dorsal Horn». *Pain* 152(4):912-23. doi: 10.1016/j.pain.2011.01.016.
- Kopach, Olga, Volodymyr Krotov, Pavel Belan, y Nana Voitenko. 2015. «Inflammatory-Induced Changes in Synaptic Drive and Postsynaptic AMPARs in Lamina II Dorsal Horn Neurons Are Cell-Type Specific». *Pain* 156(3):428-38. doi: 10.1097/01.j.pain.0000460318.65734.00.
- Koutlas, Ioannis, Louisa E. Linders, Stef E. van der Starre, Inge G. Wolterink-Donselaar, Roger A. H. Adan, y Frank J. Meye. 2022. «Characterizing and TRAPing a Social Stress-Activated

- Neuronal Ensemble in the Ventral Tegmental Area». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 16. doi: 10.3389/fnbeh.2022.936087.
- Krügel, Ute, Isabelle Straub, Holger Beckmann, y Michael Schaefer. 2017. «Primidone Inhibits TRPM3 and Attenuates Thermal Nociception in Vivo». *Pain* 158(5):856-67. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000846.
- Krzyzanowska, Agnieszka, Silvia Pittolo, Marina Cabrerizo, Jorge Sánchez-López, Senthil Krishnasamy, César Venero, y Carlos Avendaño. 2011. «Assessing nociceptive sensitivity in mouse models of inflammatory and neuropathic trigeminal pain». *Journal of Neuroscience Methods* 201(1):46-54. doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.07.006.
- Kwan, Kelvin Y., Joshua M. Glazer, David P. Corey, Frank L. Rice, y Cheryl L. Stucky. 2009. «TRPA1 Modulates Mechanotransduction in Cutaneous Sensory Neurons». *The Journal of Neuroscience* 29(15):4808. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5380-08.2009.
- Larsson, Max. 2017. «Pax2 Is Persistently Expressed by GABAergic Neurons throughout the Adult Rat Dorsal Horn». *Neuroscience Letters* 638:96-101. doi: 10.1016/j.neulet.2016.12.015.
- Latremoliere, Alban, y Clifford J. Woolf. 2009. «Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity». *The Journal of Pain* 10(9):895-926. doi: 10.1016/j.jpain.2009.06.012.
- Lechner, Stefan G. 2017. «An Update on the Spinal and Peripheral Pathways of Pain Signalling». *E-Neuroforum* 23(3):131-36. doi: 10.1515/nf-2017-A020.
- Lee, H., T. Iida, A. Mizuno, M. Suzuki, y M. J. Caterina. 2005. «Altered Thermal Selection Behavior in Mice Lacking Transient Receptor Potential Vanilloid 4». *Journal of Neuroscience* 25(5):1304-10. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4745.04.2005.
- Levy, Sabrina L., Joshua J. White, y Roy V. Sillitoe. 2015. «Wheat Germ Agglutinin (WGA) Tracing: A Classic Approach for Unraveling Neural Circuitry». Pp. 51-66 en *Neural Tracing Methods: Tracing Neurons and Their Connections*, editado por B. R. Arenkiel. New York, NY: Springer.
- Li, Qian, Cheng-Hao Guo, Mohammed Ali Chowdhury, Tao-Li Dai, y Wei Han. 2016. «TRPA1 in the spinal dorsal horn is involved in post-inflammatory visceral hypersensitivity: in vivo study using TNBS-treated rat model». *Journal of Pain Research* 9:1153-60. doi: 10.2147/JPR.S118581.
- Li, Tianci, Gao Wang, Vivian Chin Chin Hui, Daniel Saad, Joao de Sousa Valente, Paolo La Montanara, y Istvan Nagy. 2021. «TRPV1 Feed-Forward Sensitisation Depends on COX2 Upregulation in Primary Sensory Neurons». *Scientific Reports* 11(1):3514. doi: 10.1038/s41598-021-82829-6.
- Li, Xiangqi, Geoff Lighthall, De-Yong Liang, y J. David Clark. 2004. «Alterations in Spinal Cord Gene Expression after Hindpaw Formalin Injection». *Journal of Neuroscience Research* 78(4):533-41. doi: 10.1002/jnr.20274.
- Li, Xu, Junwei Hu, Xuedan Zhao, Juanjuan Li, y Yuelai Chen. 2022. «Piezo Channels in the Urinary System». *Experimental & Molecular Medicine* 54(6):697-710. doi: 10.1038/s12276-022-00777-1.

- Liang, Lingli, Longchang Fan, Bo Tao, Myron Yaster, y Yuan-Xiang Tao. 2013. «Protein Kinase B/Akt Is Required for Complete Freund's Adjuvant-Induced Upregulation of Nav1.7 and Nav1.8 in Primary Sensory Neurons». *The Journal of Pain* 14(6):638-47. doi: 10.1016/j.jpain.2013.01.778.
- Littlewood, N. K., A. J. Todd, R. C. Spike, C. Watt, y S. A. Shehab. 1995. «The Types of Neuron in Spinal Dorsal Horn Which Possess Neurokinin-1 Receptors». *Neuroscience* 66(3):597-608. doi: 10.1016/0306-4522(95)00039-I.
- Liu, Xu, Steve Ramirez, Petti T. Pang, Corey B. Puryear, Arvind Govindarajan, Karl Deisseroth, y Susumu Tonegawa. 2012. «Optogenetic Stimulation of a Hippocampal Engram Activates Fear Memory Recall». *Nature* 484(7394):381-85. doi: 10.1038/nature11028.
- Loeser, John D., y Rolf-Detlef Treede. 2008. «The Kyoto Protocol of IASP Basic Pain Terminology☆». *PAIN* 137(3):473. doi: 10.1016/j.pain.2008.04.025.
- Lu, Ying, De Li Cao, Ling Jie Ma, y Yong Jing Gao. 2021. «TRAF6 Contributes to CFA-Induced Spinal Microglial Activation and Chronic Inflammatory Pain in Mice». *Cellular and Molecular Neurobiology*. doi: 10.1007/s10571-021-01045-y.
- Ma, Q. P., y C. J. Woolf. 1996. «Basal and Touch-Evoked Fos-like Immunoreactivity during Experimental Inflammation in the Rat». *Pain* 67(2-3):307-16. doi: 10.1016/0304-3959(96)03132-6.
- Macpherson, Lindsey J., Adrienne E. Dubin, Michael J. Evans, Felix Marr, Peter G. Schultz, Benjamin F. Cravatt, y Ardem Patapoutian. 2007. «Noxious Compounds Activate TRPA1 Ion Channels through Covalent Modification of Cysteines». *Nature* 445(7127):541-45. doi: 10.1038/nature05544.
- Madisen, Linda, Theresa A. Zwingman, Susan M. Sunkin, Seung Wook Oh, Hatim A. Zariwala, Hong Gu, Lydia L. Ng, Richard D. Palmiter, Michael J. Hawrylycz, Allan R. Jones, Ed S. Lein, y Hongkui Zeng. 2010. «A Robust and High-Throughput Cre Reporting and Characterization System for the Whole Mouse Brain». *Nature Neuroscience* 13(1):133-40. doi: 10.1038/nn.2467.
- Maeda, Sanae, Ai Kawamoto, Yumi Yatani, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, y Shuji Kaneko. 2008. «Gene transfer of GLT-1, a glial glutamate transporter, into the spinal cord by recombinant adenovirus attenuates inflammatory and neuropathic pain in rats». *Molecular Pain* 4:65. doi: 10.1186/1744-8069-4-65.
- Malik-Hall, Misbah, Olayinka A. Dina, y Jon D. Levine. 2005. «Primary Afferent Nociceptor Mechanisms Mediating NGF-Induced Mechanical Hyperalgesia». *European Journal of Neuroscience* 21(12):3387-94. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04173.x.
- Malin, Sacha A., Brian M. Davis, y Derek C. Molliver. 2007. «Production of Dissociated Sensory Neuron Cultures and Considerations for Their Use in Studying Neuronal Function and Plasticity». *Nature Protocols* 2(1):152-60. doi: 10.1038/nprot.2006.461.
- Malin, Sacha, Derek Molliver, Julie A. Christianson, Erica S. Schwartz, Pam Cornuet, Kathryn M. Albers, y Brian M. Davis. 2011. «TRPV1 and TRPA1 Function and Modulation Are Target Tissue Dependent». *Journal of Neuroscience* 31(29):10516-28. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2992-10.2011.

- Malmberg, A. B., y T. L. Yaksh. 1995. «Cyclooxygenase Inhibition and the Spinal Release of Prostaglandin E2 and Amino Acids Evoked by Paw Formalin Injection: A Microdialysis Study in Unanesthetized Rats». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 15(4):2768-76. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-04-02768.1995.
- Malmberg, Annika B., Chong Chen, Susumu Tonegawa, y Allan I. Basbaum. 1997. «Preserved Acute Pain and Reduced Neuropathic Pain in Mice Lacking PKC γ ». *Science* 278(5336):279-83. doi: 10.1126/science.278.5336.279.
- Mantyh, P. W., S. D. Rogers, P. Honore, B. J. Allen, J. R. Ghilardi, J. Li, R. S. Daughters, D. A. Lappi, R. G. Wiley, y D. A. Simone. 1997. «Inhibition of Hyperalgesia by Ablation of Lamina I Spinal Neurons Expressing the Substance P Receptor». *Science (New York, N.Y.)* 278(5336):275-79. doi: 10.1126/science.278.5336.275.
- Marieb. 2019. «The Autonomic Nervous System and Visceral Sensory Neurons».
- Martínez-Rojas, Vladimir A., Guadalupe García, Roxana Noriega-Navarro, Crystell G. Guzmán-Priego, Jorge E. Torres-López, Vinicio Granados-Soto, y Janet Murbartían. 2018. «Peripheral and spinal TRPA1 channels contribute to formalin-induced long-lasting mechanical hypersensitivity». *Journal of Pain Research* 11:51-60. doi: 10.2147/JPR.S153671.
- Mason, Matthew RJ, Erich ME Ehlert, Ruben Eggers, Chris W. Pool, Stephan Hermening, Angelina Huseinovic, Eric Timmermans, Bas Blits, y Joost Verhaagen. 2010. «Comparison of AAV Serotypes for Gene Delivery to Dorsal Root Ganglion Neurons». *Molecular Therapy* 18(4):715-24. doi: 10.1038/mt.2010.19.
- McCarson, Kenneth E., y Jill C. Fehrenbacher. 2021. «Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant (CFA)–Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat». *Current Protocols* 1(7). doi: 10.1002/cpz1.202.
- McGlone, Francis, Johan Wessberg, y Håkan Olausson. 2014. «Discriminative and Affective Touch: Sensing and Feeling». *Neuron* 82(4):737-55. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.001.
- McMahon, S. B., Patrick D. Wall, Ronald Melzack, y Stephen B. McMahon, eds. 2013. *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. 6. ed. Philadelphia, Pa: Elsevier, Saunders.
- McNamara, Colleen R., Josh Mandel-Brehm, Diana M. Bautista, Jan Siemens, Kari L. Deranian, Michael Zhao, Neil J. Hayward, Jayhong A. Chong, David Julius, Magdalene M. Moran, y Christopher M. Fanger. 2007. «TRPA1 Mediates Formalin-Induced Pain». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(33):13525-30. doi: 10.1073/pnas.0705924104.
- McNaughton, L. A., y S. P. Hunt. 1992. «Regulation of Gene Expression in Astrocytes by Excitatory Amino Acids». *Molecular Brain Research* 16(3-4):261-66. doi: 10.1016/0169-328X(92)90234-3.
- Melzack, R., y P. D. Wall. 1965. «Pain Mechanisms: A New Theory». *Science (New York, N.Y.)* 150(3699):971-79. doi: 10.1126/science.150.3699.971.
- Meng, Chong, Xin Zhao, y Jie Lao. 2018. «A Modified Immunofluorescence in Situ Hybridization Method to Detect Long Non-Coding RNAs and Proteins in Frozen Spinal Cord Sections». *Experimental and Therapeutic Medicine* 15(6):4623-28. doi: 10.3892/etm.2018.6046.

- Meseguer, Victor, Yeranddy A. Alpizar, Enoch Luis, Sendoa Tajada, Bristol Denlinger, Otto Fajardo, Jan-Albert Manenschijn, Carlos Fernández-Peña, Arturo Talavera, Tatiana Kichko, Belén Navia, Alicia Sánchez, Rosa Señarís, Peter Reeh, María Teresa Pérez-García, José Ramón López-López, Thomas Voets, Carlos Belmonte, Karel Talavera, y Félix Viana. 2014. «TRPA1 Channels Mediate Acute Neurogenic Inflammation and Pain Produced by Bacterial Endotoxins». *Nature Communications* 5(1):3125. doi: 10.1038/ncomms4125.
- Miao, Bei, Hongyu Yao, Peng Chen, y Xue-Jun Song. 2022. «Differential Activation of pERK1/2 and c-Fos Following Injury to Different Regions of Primary Sensory Neuron». *Life* 12(5):752. doi: 10.3390/life12050752.
- Mitrovic, Martina, Anaid Shahbazian, Elisabeth Bock, Maria A. Pabst, y Peter Holzer. 2010. «Chemo-Nociceptive Signalling from the Colon Is Enhanced by Mild Colitis and Blocked by Inhibition of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channels». *British Journal of Pharmacology* 160(6):1430-42. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00794.x.
- Moayed, Massieh, y Karen D. Davis. 2013. «Theories of pain: from specificity to gate control». *Journal of Neurophysiology* 109(1):5-12. doi: 10.1152/jn.00457.2012.
- Molander, C. 1986. «Laminar Distribution and Somatotopic Organization of the Primary Afferent Fibers from Hindlimb Nerves in the Dorsal Horn. A Study by Transganglionic Transport of Horseradish Peroxidase in the Rat».
- Molander, C., J. Hongpaisan, y J. K. Persson. 1994. «Distribution of C-Fos Expressing Dorsal Horn Neurons after Electrical Stimulation of Low Threshold Sensory Fibers in the Chronically Injured Sciatic Nerve». *Brain Research* 644(1):74-82. doi: 10.1016/0006-8993(94)90349-2.
- Montell, C., y G. M. Rubin. 1989. «Molecular Characterization of the Drosophila Trp Locus: A Putative Integral Membrane Protein Required for Phototransduction». *Neuron* 2(4):1313-23. doi: 10.1016/0896-6273(89)90069-x.
- Moparthy, Lavanya, Tatjana I. Kichko, Mirjam Eberhardt, Edward D. Högestätt, Per Kjellbom, Urban Johanson, Peter W. Reeh, Andreas Leffler, Milos R. Filipovic, y Peter M. Zygmunt. 2016. «Human TRPA1 Is a Heat Sensor Displaying Intrinsic U-Shaped Thermosensitivity». *Scientific Reports* 6(1):28763. doi: 10.1038/srep28763.
- Moparthy, Lavanya, Viktor Sinica, Vamsi K. Moparthy, Mohamed Kreir, Thibaut Vignane, Milos R. Filipovic, Viktorie Vlachova, y Peter M. Zygmunt. 2022. «The Human TRPA1 Intrinsic Cold and Heat Sensitivity Involves Separate Channel Structures beyond the N-ARD Domain». *Nature Communications* 13(1):6113. doi: 10.1038/s41467-022-33876-8.
- Mogrich, Aziz, Sun Wook Hwang, Taryn J. Earley, Matt J. Petrus, Amber N. Murray, Kathryn S. R. Spencer, Mary Andahazy, Gina M. Story, y Ardem Patapoutian. 2005. «Impaired Thermosensation in Mice Lacking TRPV3, a Heat and Camphor Sensor in the Skin». *Science* 307(5714):1468-72. doi: 10.1126/science.1108609.
- Morgan, J. I., D. R. Cohen, J. L. Hempstead, y T. Curran. 1987. «Mapping Patterns of C-Fos Expression in the Central Nervous System after Seizure». *Science (New York, N.Y.)* 237(4811):192-97. doi: 10.1126/science.3037702.

- Moriyama, Tomoko, Tomohiro Higashi, Kazuya Togashi, Tohko Iida, Eri Segi, Yukihiro Sugimoto, Tomoko Tominaga, Shuh Narumiya, y Makoto Tominaga. 2005. «Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins». *Molecular Pain* 1:3. doi: 10.1186/1744-8069-1-3.
- Morris, Christopher J. 2003. «Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 225:115-21. doi: 10.1385/1-59259-374-7:115.
- Murthy, Swetha E., Meaghan C. Loud, Ihab Daou, Kara L. Marshall, Frederick Schwaller, Johannes Kühnemund, Allain G. Francisco, William T. Keenan, Adrienne E. Dubin, Gary R. Lewin, y Ardem Patapoutian. 2018. «The Mechanosensitive Ion Channel Piezo2 Mediates Sensitivity to Mechanical Pain in Mice». *Science Translational Medicine* 10(462):eaat9897. doi: 10.1126/scitranslmed.aat9897.
- Naert, Robbe, Alejandro López-Requena, y Karel Talavera. 2021. «TRPA1 Expression and Pathophysiology in Immune Cells». *International Journal of Molecular Sciences* 22(21):11460. doi: 10.3390/ijms222111460.
- Nagata, K., A. Duggan, G. Kumar, y J. García-Añoveros. 2005. «Nociceptor and Hair Cell Transducer Properties of TRPA1, a Channel for Pain and Hearing». *Journal of Neuroscience* 25(16):4052-61. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0013-05.2005.
- Nagel, Georg, Tanjef Szellas, Wolfram Huhn, Suneel Kateriya, Nona Adeishvili, Peter Berthold, Doris Ollig, Peter Hegemann, y Ernst Bamberg. 2003. «Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(24):13940-45. doi: 10.1073/pnas.1936192100.
- Naik, Aijaz Ahmad, Anastasia Brodovskaya, Smriti Subedi, Amman Akram, y Jaideep Kapur. 2022. «Extrahippocampal Seizure and Memory Circuits Overlap». *eNeuro* 9(4):ENEURO.0179-22.2022. doi: 10.1523/ENEURO.0179-22.2022.
- Nassenstein, Christina, Kevin Kwong, Thomas Taylor-Clark, Marian Kollarik, Donald M. MacGlashan, Armin Braun, y Bradley J. Undem. 2008. «Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs». *The Journal of Physiology* 586(Pt 6):1595-1604. doi: 10.1113/jphysiol.2007.148379.
- Neumann, Simona, Joao M. Braz, Kate Skinner, Ida J. Llewellyn-Smith, y Allan I. Basbaum. 2008. «Innocuous, Not Noxious, Input Activates PKC γ Interneurons of the Spinal Dorsal Horn via Myelinated Afferent Fibers». *Journal of Neuroscience* 28(32):7936-44. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1259-08.2008.
- Nilius, Bernd, Giovanni Appendino, y Grzegorz Owsianik. 2012. «The Transient Receptor Potential Channel TRPA1: From Gene to Pathophysiology». *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 464(5):425-58. doi: 10.1007/s00424-012-1158-z.
- Nilius, Bernd, y Veit Flockerzi, eds. 2014. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels: Volume I*. Vol. 222. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Nilius, Bernd, y Arpad Szallasi. 2014. «Transient Receptor Potential Channels as Drug Targets: From the Science of Basic Research to the Art of Medicine». *Pharmacological Reviews* 66(3):676-814. doi: 10.1124/pr.113.008268.

- Packer, Adam M., Lloyd E. Russell, Henry W. P. Dalglish, y Michael Häusser. 2015. «Simultaneous All-Optical Manipulation and Recording of Neural Circuit Activity with Cellular Resolution in Vivo». *Nature Methods* 12(2):140-46. doi: 10.1038/nmeth.3217.
- Pan, Haili, Mahar Fatima, Alan Li, Hankyu Lee, Wei Cai, Lorraine Horwitz, Chia Chun Hor, Nizam Zaher, Mitchell Cin, Hannah Slade, Tianwen Huang, X. Z. Shawn Xu, y Bo Duan. 2019. «Identification of a Spinal Circuit for Mechanical and Persistent Spontaneous Itch». *Neuron* 103(6):1135-1149.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2019.06.016.
- Paricio-Montesinos, Ricardo, Frederick Schwaller, Annapoorani Udhayachandran, Florian Rau, Jan Walcher, Roberta Evangelista, Joris Vriens, Thomas Voets, James F. A. Poulet, y Gary R. Lewin. 2020. «The Sensory Coding of Warm Perception». *Neuron* 106(5):830-841.e3. doi: 10.1016/j.neuron.2020.02.035.
- Park, Jang-Su, Myron Yaster, Xiaowei Guan, Ji-Tian Xu, Ming-Hung Shih, Yun Guan, Srinivasa N. Raja, y Yuan-Xiang Tao. 2008. «Role of Spinal Cord Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid Receptors in Complete Freund's Adjuvant-Induced Inflammatory Pain». *Molecular Pain* 4:67. doi: 10.1186/1744-8069-4-67.
- Patil, Mayur J., Seol-Hee Kim, Parmvir K. Bahia, Sanjay S. Nair, Teresa S. Darcey, Jailene Fiallo, Xiao Xia Zhu, Robert D. Frisina, Stephen H. Hadley, y Thomas E. Taylor-Clark. 2023. «A Novel Flp Reporter Mouse Shows That TRPA1 Expression Is Largely Limited to Sensory Neuron Subsets». *eNeuro* 10(12). doi: 10.1523/ENEURO.0350-23.2023.
- Patterson, Laurel M., Huiyuan Zheng, Sean M. Ward, y Hans-Rudolf Berthoud. 2003. «Vanilloid Receptor (VR1) Expression in Vagal Afferent Neurons Innervating the Gastrointestinal Tract». *Cell and Tissue Research* 311(3):277-87. doi: 10.1007/s00441-002-0682-0.
- Peirs, Cedric, Radhouane Dallel, y Andrew J. Todd. 2020. «Recent Advances in Our Understanding of the Organization of Dorsal Horn Neuron Populations and Their Contribution to Cutaneous Mechanical Allodynia». *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* 127(4):505-25. doi: 10.1007/s00702-020-02159-1.
- Peirs, Cédric, Sudarshan Patil, Rabia Bouali-Benazzouz, Alain Artola, Marc Landry, y Radhouane Dallel. 2014. «Protein Kinase C Gamma Interneurons in the Rat Medullary Dorsal Horn: Distribution and Synaptic Inputs to These Neurons, and Subcellular Localization of the Enzyme». *The Journal of Comparative Neurology* 522(2):393-413. doi: 10.1002/cne.23407.
- Peirs, Cedric, y Rebecca P. Seal. 2016. «Neural Circuits for Pain: Recent Advances and Current Views». *Science* 354(6312):578-84. doi: 10.1126/science.aaf8933.
- Peirs, Cedric, Sean-Paul G. Williams, Xinyi Zhao, Cynthia M. Arokiaraj, David W. Ferreira, Myungchul Noh, Kelly M. Smith, Priyabrata Halder, Kelly A. Corrigan, Jeremy Y. Gedeon, Suh Jin Lee, Graziana Gatto, David Chi, Sarah E. Ross, Martyn Goulding, y Rebecca P. Seal. 2021. «Mechanical Allodynia Circuitry in the Dorsal Horn Is Defined by the Nature of the Injury». *Neuron* 109(1):73-90.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2020.10.027.
- Perkins, Katherine L. 2006. «Cell-Attached Voltage-Clamp and Current-Clamp Recording and Stimulation Techniques in Brain Slices». *Journal of Neuroscience Methods* 154(1):1-18. doi: 10.1016/j.jneumeth.2006.02.010.

- Petitjean, Hugues, Sophie Anne Pawlowski, Steven Li Fraine, Behrang Sharif, Doulia Hamad, Tarheen Fatima, Jim Berg, Claire M. Brown, Lily-Yeh Jan, Alfredo Ribeiro-da-Silva, Joao M. Braz, Allan I. Basbaum, y Reza Sharif-Naeini. 2015. «Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury». *Cell Reports* 13(6):1246-57. doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.080.
- Petrus, Matt, Andrea M. Peier, Michael Bandell, Sun Wook Hwang, Truc Huynh, Nicholas Olney, Tim Jegla, y Ardem Patapoutian. 2007. «A Role of TRPA1 in Mechanical Hyperalgesia Is Revealed by Pharmacological Inhibition». *Molecular Pain* 3:40. doi: 10.1186/1744-8069-3-40.
- Pham, Bau N., Jiangyuan Luo, Harnadar Anand, Olivia Kola, Pia Salcedo, Connie Nguyen, Sarah Gaunt, Hui Zhong, Alan Garfinkel, Niranjala Tillakaratne, y V. Reggie Edgerton. 2020. «Redundancy and Multifunctionality among Spinal Locomotor Networks». *Journal of Neurophysiology* 124(5):1469-79. doi: 10.1152/jn.00338.2020.
- Pinto, Larissa G., Guilherme R. Souza, Ricardo Kusuda, Alexandre H. Lopes, Morena B. Sant'Anna, Fernando Q. Cunha, Sérgio H. Ferreira, y Thiago M. Cunha. 2019. «Non-Peptidergic Nociceptive Neurons Are Essential for Mechanical Inflammatory Hypersensitivity in Mice». *Molecular Neurobiology* 56(8):5715-28. doi: 10.1007/s12035-019-1494-5.
- Pitzer, Claudia, Rohini Kuner, y Anke Tappe-Theodor. 2016. «Voluntary and evoked behavioral correlates in inflammatory pain conditions under different social housing conditions». *Pain Reports* 1(1):E564. doi: 10.1097/PR9.0000000000000564.
- Pogatzki-Zahn, Esther M., David Gomez-Varela, Gerrit Erdmann, Katharina Kaschube, Daniel Segelcke, y Manuela Schmidt. 2021. «A proteome signature for acute incisional pain in dorsal root ganglia of mice». *Pain* 162(7):2070-86. doi: 10.1097/j.pain.0000000000002207.
- Polgár, E., J. H. Fowler, M. M. McGill, y A. J. Todd. 1999. «The Types of Neuron Which Contain Protein Kinase C Gamma in Rat Spinal Cord». *Brain Research* 833(1):71-80. doi: 10.1016/s0006-8993(99)01500-0.
- Polgár, Erika, Khulood M. Al-Khater, Safa Shehab, Masahiko Watanabe, y Andrew J. Todd. 2008. «Large Projection Neurons in Lamina I of the Rat Spinal Cord That Lack the Neurokinin 1 Receptor Are Densely Innervated by VGLUT2-Containing Axons and Possess GluR4-Containing AMPA Receptors». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 28(49):13150-60. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4053-08.2008.
- Polgár, Erika, Camille Durrieux, David I. Hughes, y Andrew J. Todd. 2013. «A Quantitative Study of Inhibitory Interneurons in Laminae I-III of the Mouse Spinal Dorsal Horn». *PloS One* 8(10):e78309. doi: 10.1371/journal.pone.0078309.
- Polgár, Erika, Thomas C. P. Sardella, Sheena Y. X. Tiong, Samantha Locke, Masahiko Watanabe, y Andrew J. Todd. 2013. «Functional Differences between Neurochemically Defined Populations of Inhibitory Interneurons in the Rat Spinal Dorsal Horn». *PAIN®* 154(12):2606-15. doi: 10.1016/j.pain.2013.05.001.
- Poole, Daniel P., Juan Carlos Pelayo, Fiore Cattaruzza, Yien-Ming Kuo, Gregory Gai, Jonathon V. Chiu, Romke Bron, John B. Furness, Eileen F. Grady, y Nigel W. Bunnett. 2011. «Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Is Expressed by Inhibitory Motoneurons of the Mouse

- Intestine». *Gastroenterology* 141(2):565-75, 575.e1-4. doi: 10.1053/j.gastro.2011.04.049.
- Premkumar, Louis S., y Gerard P. Ahern. 2000. «Induction of Vanilloid Receptor Channel Activity by Protein Kinase C». *Nature* 408(6815):985-90. doi: 10.1038/35050121.
- Price, D. D. 2000. «Psychological and Neural Mechanisms of the Affective Dimension of Pain». *Science (New York, N.Y.)* 288(5472):1769-72. doi: 10.1126/science.288.5472.1769.
- Punnakkal, Pradeep, Carolin Schoultz, Karen Haenraets, Hendrik Wildner, y Hanns Ulrich Zeilhofer. 2014. «Morphological, biophysical and synaptic properties of glutamatergic neurons of the mouse spinal dorsal horn». *The Journal of Physiology* 592(Pt 4):759-76. doi: 10.1113/jphysiol.2013.264937.
- Purves, Dale, George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, y Anthony-Samuel LaMantia. 2018. *Neuroscience*. Oxford University Press.
- Qi, Lijun, Michael Iskols, David Shi, Pranav Reddy, Christopher Walker, Karina Lezgiyeva, Tiphaine Voisin, Mathias Pawlak, Vijay K. Kuchroo, Isaac M. Chiu, David D. Ginty, y Nikhil Sharma. 2024. «A Mouse DRG Genetic Toolkit Reveals Morphological and Physiological Diversity of Somatosensory Neuron Subtypes». *Cell* 187(6):1508-1526.e16. doi: 10.1016/j.cell.2024.02.006.
- Quallo, Talisia, Clive Gentry, Stuart Bevan, Lisa M. Broad, y Adrian J. Mogg. 2015. «Activation of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Induces CGRP Release from Spinal Cord Synaptosomes». *Pharmacology Research & Perspectives* 3(6):e00191. doi: 10.1002/prp2.191.
- Raisinghani, Manish, Linlin Zhong, Joseph A. Jeffry, Mahendra Bishnoi, Reddy M. Pabbidi, Fátima Pimentel, De-Shou Cao, M. Steven Evans, y Louis S. Premkumar. 2011. «Activation characteristics of transient receptor potential ankyrin 1 and its role in nociception». *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 301(3):C587-600. doi: 10.1152/ajpcell.00465.2010.
- Ran, Chen, Gabrielle N. A. Kamalani, y Xiaoke Chen. 2021. «Modality-Specific Modulation of Temperature Representations in the Spinal Cord after Injury». *The Journal of Neuroscience* 41(39):8210-19. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1104-21.2021.
- Reijmers, Leon G., Brian L. Perkins, Naoki Matsuo, y Mark Mayford. 2007. «Localization of a Stable Neural Correlate of Associative Memory». *Science* 317(5842):1230-33. doi: 10.1126/science.1143839.
- Renault, Renaud, Nirit Sukenik, Stéphanie Descroix, Laurent Malaquin, Jean-Louis Viovy, Jean-Michel Peyrin, Samuel Bottani, Pascal Monceau, Elisha Moses, y Maéva Vignes. 2015. «Combining Microfluidics, Optogenetics and Calcium Imaging to Study Neuronal Communication In Vitro». *PLoS ONE* 10(4):e0120680. doi: 10.1371/journal.pone.0120680.
- Rexed, B. 1954. «A Cytoarchitectonic Atlas of the Spinal Cord in the Cat». *The Journal of Comparative Neurology* 100(2):297-379. doi: 10.1002/cne.901000205.

- Rickgauer, John Peter, Karl Deisseroth, y David W. Tank. 2014. «Simultaneous Cellular-Resolution Optical Perturbation and Imaging of Place Cell Firing Fields». *Nature Neuroscience* 17(12):1816-24. doi: 10.1038/nn.3866.
- Rigaud, Marcel, Geza Gemes, Marie-Elizabeth Barabas, Donna I. Chernoff, Stephen E. Abram, Cheryl L. Stucky, y Quinn H. Hogan. 2008. «Species and strain differences in rodent sciatic nerve anatomy: Implications for studies of neuropathic pain». *Pain* 136(1-2):188-201. doi: 10.1016/j.pain.2008.01.016.
- Robertson, G. S., J. G. Pfaus, L. J. Atkinson, H. Matsumura, A. G. Phillips, y H. C. Fibiger. 1991. «Sexual Behavior Increases C-Fos Expression in the Forebrain of the Male Rat». *Brain Research* 564(2):352-57. doi: 10.1016/0006-8993(91)91477-i.
- Romero, A., Ana González-Cuello, M. Laorden, A. Campillo, Nuno Vasconcelos, Elizabeth Romero-Alejo, y M. Puig. 2011. «Effects of surgery and/or remifentanyl administration on the expression of pERK1/2, c-Fos and dynorphin in the dorsal root ganglia in mice». *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 385:397-409. doi: 10.1007/s00210-011-0721-z.
- Ross, Sarah E., Alan R. Mardinly, Alejandra E. McCord, Jonathan Zurawski, Sonia Cohen, Cynthia Jung, Linda Hu, Stephanie I. Mok, Anar Shah, Erin M. Savner, Christos Tolias, Roman Corfas, Suzhen Chen, Perrine Inquimbert, Yi Xu, Roderick R. McInnes, Frank L. Rice, Gabriel Corfas, Qiufu Ma, Clifford J. Woolf, y Michael E. Greenberg. 2010. «Loss of Inhibitory Interneurons in the Dorsal Spinal Cord and Elevated Itch in Bhlhb5 Mutant Mice». *Neuron* 65(6):886-98. doi: 10.1016/j.neuron.2010.02.025.
- Rothstein, J. D., M. Dykes-Hoberg, C. A. Pardo, L. A. Bristol, L. Jin, R. W. Kuncl, Y. Kanai, M. A. Hediger, Y. Wang, J. P. Schielke, y D. F. Welty. 1996. «Knockout of Glutamate Transporters Reveals a Major Role for Astroglial Transport in Excitotoxicity and Clearance of Glutamate». *Neuron* 16(3):675-86. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80086-0.
- Rudy, B., y C. J. McBain. 2001. «Kv3 Channels: Voltage-Gated K⁺ Channels Designed for High-Frequency Repetitive Firing». *Trends in Neurosciences* 24(9):517-26. doi: 10.1016/s0166-2236(00)01892-0.
- Rusanescu, Gabriel. 2016. «Adult spinal cord neurogenesis: A regulator of nociception». *Neurogenesis* 3(1):e1256853. doi: 10.1080/23262133.2016.1256853.
- Russ, Daniel E., Ryan B. Patterson Cross, Li Li, Stephanie C. Koch, Kaya J. E. Matson, Archana Yadav, Mor R. Alkaslasi, Dylan I. Lee, Claire E. Le Pichon, Vilas Menon, y Ariel J. Levine. 2021. «A Harmonized Atlas of Mouse Spinal Cord Cell Types and Their Spatial Organization». *Nature Communications* 12(1):5722. doi: 10.1038/s41467-021-25125-1.
- Sagar, S. M., F. R. Sharp, y T. Curran. 1988. «Expression of C-Fos Protein in Brain: Metabolic Mapping at the Cellular Level». *Science (New York, N.Y.)* 240(4857):1328-31. doi: 10.1126/science.3131879.
- Saint Marie, R. L., L. Luo, y A. F. Ryan. 1999. «Effects of Stimulus Frequency and Intensity on C-Fos mRNA Expression in the Adult Rat Auditory Brainstem». *The Journal of Comparative Neurology* 404(2):258-70. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19990208)404:2<258::aid-cne9>3.0.co;2-u.

- Sakaguchi, Masanori, y Yasunori Hayashi. 2012. «Catching the engram: strategies to examine the memory trace». *Molecular Brain* 5(1):32. doi: 10.1186/1756-6606-5-32.
- Sasaki, M., C. Tohda, y Y. Kuraishi. 1998. «Region-Specific Increase in Glutamate Release from Dorsal Horn of Rats with Adjuvant Inflammation». *Neuroreport* 9(14):3219-22. doi: 10.1097/00001756-199810050-00016.
- Schechter, Leslyann C., Alexander A. Pazevic, Ruian Yang, Kimberly Matulef, y Sharona E. Gordon. 2020. «TRPV1, TRPA1, and TRPM8 are expressed in axon terminals in the cornea: TRPV1 axons contain CGRP and secretogranin II; TRPA1 axons contain secretogranin 3». Recuperado 11 de mayo de 2023 (<http://www.molvis.org/molvis/v26/576/>).
- Schepers, Raf J., y Matthias Ringkamp. 2010. «Thermoreceptors and Thermosensitive Afferents». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 34(2):177-84. doi: 10.1016/j.neubiorev.2009.10.003.
- Schicho, Rudolf, Waltraud Florian, Ingrid Liebmann, Peter Holzer, y Irmgard Th Lippe. 2004. «Increased Expression of TRPV1 Receptor in Dorsal Root Ganglia by Acid Insult of the Rat Gastric Mucosa». *The European Journal of Neuroscience* 19(7):1811-18. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03290.x.
- Schmidt, R., M. Schmelz, C. Forster, M. Ringkamp, E. Torebjork, y H. Handwerker. 1995. «Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin». *The Journal of Neuroscience* 15(1):333-41. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-01-00333.1995.
- Sekiguchi, Kohei J., Pavel Shekhtmeyster, Katharina Merten, Alexander Arena, Daniela Cook, Elizabeth Hoffman, Alexander Ngo, y Axel Nimmerjahn. 2016. «Imaging Large-Scale Cellular Activity in Spinal Cord of Freely Behaving Mice». *Nature Communications* 7(1):11450. doi: 10.1038/ncomms11450.
- Shaffer, Clare, Lisa Feldman Barrett, y Karen S. Quigley. 2023. «Signal processing in the vagus nerve: Hypotheses based on new genetic and anatomical evidence». *Biological Psychology* 182:108626. doi: 10.1016/j.biopsycho.2023.108626.
- Shao, Shan. 2023. «Ventral Hippocampal CA1 Modulates Pain Behaviors in Mice with Peripheral Inflammation». *OPEN ACCESS*.
- Sheahan, Tayler D., Edward R. Siuda, Michael R. Bruchas, Andrew J. Shepherd, Durga P. Mohapatra, Robert W. Gereau, y Judith P. Golden. 2017. «Inflammation and nerve injury minimally affect mouse voluntary behaviors proposed as indicators of pain». *Neurobiology of Pain* 2:1-12. doi: 10.1016/j.ynpai.2017.09.001.
- Shechter, Ravid, Yaniv Ziv, y Michal Schwartz. 2007. «New GABAergic Interneurons Supported by Myelin-Specific T Cells Are Formed in Intact Adult Spinal Cord». *Stem Cells* 25(9):2277-82. doi: 10.1634/stemcells.2006-0705.
- Shekhtmeyster, Pavel, Daniela Duarte, Erin M. Carey, Alexander Ngo, Grace Gao, Jack A. Olmstead, Nicholas A. Nelson, y Axel Nimmerjahn. 2023. «Trans-Segmental Imaging in the Spinal Cord of Behaving Mice». *Nature Biotechnology* 41(12):1729-33. doi: 10.1038/s41587-023-01700-3.

- Shen, Shiqian, Weihua Ding, Shihab Ahmed, Ranliang Hu, Arissa Opalacz, Sarah Roth, Zerong You, Gregory R. Wotjkiewicz, Grewo Lim, Lucy Chen, Jianren Mao, John W. Chen, y Yi Zhang. 2018. «Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Imaging Identifies Tissue and Nerve Inflammation in Pain Conditions». *Pain Medicine* 19(4):686-92. doi: 10.1093/pm/pnx267.
- Sheng, H. Z., R. D. Fields, y P. G. Nelson. 1993. «Specific Regulation of Immediate Early Genes by Patterned Neuronal Activity». *Journal of Neuroscience Research* 35(5):459-67. doi: 10.1002/jnr.490350502.
- Sheng, Morgan, y Michael E. Greenberg. 1990. «The Regulation and Function of C-Fos and Other Immediate Early Genes in the Nervous System». *Neuron* 4(4):477-85. doi: 10.1016/0896-6273(90)90106-P.
- Sherrington, Charles S. 1906. *The integrative action of the nervous system*. New Haven, CT, US: Yale University Press.
- Shields, Shannon D., Hye-Sook Ahn, Yang Yang, Chongyang Han, Rebecca P. Seal, John N. Wood, Stephen G. Waxman, y Sulayman D. Dib-Hajj. 2012. «Nav1.8 Expression Is Not Restricted to Nociceptors in Mouse Peripheral Nervous System». *PAIN* 153(10):2017. doi: 10.1016/j.pain.2012.04.022.
- Shigetomi, Eiji, Xiaoping Tong, Kelvin Y. Kwan, David P. Corey, y Baljit S. Khakh. 2012. «TRPA1 Channels Regulate Astrocyte Resting Calcium and Inhibitory Synapse Efficacy through GAT-3». *Nature Neuroscience* 15(1):70-80. doi: 10.1038/nn.3000.
- Shimshek, D. r., J. Kim, M. r. Hübner, D. j. Spergel, F. Buchholz, E. Casanova, A. f. Stewart, P. h. Seeburg, y R. Sprengel. 2002. «Codon-Improved Cre Recombinase (iCre) Expression in the Mouse». *Genesis* 32(1):19-26. doi: 10.1002/gene.10023.
- Shin, Seung Min, Brandon Itson-Zoske, Yongsong Cai, Chensheng Qiu, Bin Pan, Cheryl L. Stucky, Quinn H. Hogan, y Hongwei Yu. 2020. «Satellite Glial Cells in Sensory Ganglia Express Functional Transient Receptor Potential Ankyrin 1 That Is Sensitized in Neuropathic and Inflammatory Pain». *Molecular Pain* 16:1744806920925425. doi: 10.1177/1744806920925425.
- Shinoda, Masamichi, Masatake Asano, Daisuke Omagari, Kuniya Honda, Suzuro Hitomi, Ayano Katagiri, y Koichi Iwata. 2011. «Nerve growth factor contribution via transient receptor potential vanilloid 1 to ectopic orofacial pain». *Journal of Neuroscience* 31(19):7145-55. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0481-11.2011.
- Silva, Bianca A., Allison M. Burns, y Johannes Gräff. 2019. «A cFos Activation Map of Remote Fear Memory Attenuation». *Psychopharmacology* 236(1):369-81. doi: 10.1007/s00213-018-5000-y.
- da Silva Serra, Ines, Zoé Husson, Jonathan D. Bartlett, y Ewan St. John Smith. 2016. «Characterization of Cutaneous and Articular Sensory Neurons». *Molecular Pain* 12:1744806916636387. doi: 10.1177/1744806916636387.
- Sineshchekov, Oleg A., Kwang-Hwan Jung, y John L. Spudich. 2002. «Two Rhodopsins Mediate Phototaxis to Low- and High-Intensity Light in *Chlamydomonas Reinhardtii*». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(13):8689-94. doi: 10.1073/pnas.122243399.

- Sinha, Ghanshyam P., Pranav Prasoon, Bret N. Smith, y Bradley K. Taylor. 2021. «Fast A-type currents shape a rapidly adapting form of delayed short latency firing of excitatory superficial dorsal horn neurons that express the NPY Y1 receptor». *The Journal of physiology* 599(10):2723-50. doi: 10.1113/JP281033.
- Smith, K. M., K. A. Boyle, J. F. Madden, S. A. Dickinson, P. Jobling, R. J. Callister, D. I. Hughes, y B. A. Graham. 2015. «Functional Heterogeneity of Calretinin-Expressing Neurons in the Mouse Superficial Dorsal Horn: Implications for Spinal Pain Processing». *The Journal of Physiology* 593(19):4319-39. doi: 10.1113/JP270855.
- Snider, W. D., y S. B. McMahon. 1998. «Tackling Pain at the Source: New Ideas about Nociceptors». *Neuron* 20(4):629-32. doi: 10.1016/s0896-6273(00)81003-x.
- Soares, Holly D., Shu-Cheng Chen, y James I. Morgan. 2001. «Differential and Prolonged Expression of Fos–lacZ and Jun–lacZ in Neurons, Glia, and Muscle Following Sciatic Nerve Damage». *Experimental Neurology* 167(1):1-14. doi: 10.1006/exnr.2000.7558.
- Spencer, Nick J., Vladimir Zagorodnyuk, Simon J. Brookes, y Tim Hibberd. 2016. «Spinal Afferent Nerve Endings in Visceral Organs: Recent Advances». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 311(6):G1056-63. doi: 10.1152/ajpgi.00319.2016.
- Stein, C., M. J. Millan, y A. Herz. 1988. «Unilateral Inflammation of the Hindpaw in Rats as a Model of Prolonged Noxious Stimulation: Alterations in Behavior and Nociceptive Thresholds». *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 31(2):445-51. doi: 10.1016/0091-3057(88)90372-3.
- Stemkowski, Patrick, Agustin García-Caballero, Vinicius De Maria Gadotti, Said M'Dahoma, Shuo Huang, Stefanie Alice Gertrud Black, Lina Chen, Ivana Assis Souza, Zizhen Zhang, y Gerald Werner Zamponi. 2016. «TRPV1 Nociceptor Activity Initiates USP5/T-Type Channel-Mediated Plasticity». *Cell Reports* 17(11):2901-12. doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.047.
- Story, Gina M., Andrea M. Peier, Alison J. Reeve, Samer R. Eid, Johannes Mosbacher, Todd R. Hricik, Taryn J. Earley, Anne C. Hergarden, David A. Andersson, Sun Wook Hwang, Peter McIntyre, Tim Jegla, Stuart Bevan, y Ardem Patapoutian. 2003. «ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures». *Cell* 112(6):819-29. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00158-2.
- Sugiura, Takeshi, Khoa Dang, Kenneth Lamb, Klaus Bielefeldt, y G. F. Gebhart. 2005. «Acid-Sensing Properties in Rat Gastric Sensory Neurons from Normal and Ulcerated Stomach». *Journal of Neuroscience* 25(10):2617-27. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2894-04.2005.
- Sullivan, Steve J., y Andrei D. Sdrulla. 2022. «Excitatory and Inhibitory Neurons of the Spinal Cord Superficial Dorsal Horn Diverge in Their Somatosensory Responses and Plasticity in Vivo». *Journal of Neuroscience* 42(10):1958-73. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1860-21.2021.
- Sun, Yan-Gang, y Zhou-Feng Chen. 2007. «A Gastrin-Releasing Peptide Receptor Mediates the Itch Sensation in the Spinal Cord». *Nature* 448(7154):700-703. doi: 10.1038/nature06029.
- Sun, Yan-Gang, Zhong-Qiu Zhao, Xiu-Li Meng, Jun Yin, Xian-Yu Liu, y Zhou-Feng Chen. 2009. «Cellular Basis of Itch Sensation». *Science* 325(5947):1531-34. doi: 10.1126/science.1174868.

- Szabo, Nora E., Ronan V. da Silva, Susana G. Sotocinal, Hanns Ulrich Zeilhofer, Jeffrey S. Mogil, y Artur Kania. 2015. «Hoxb8 Intersection Defines a Role for Lmx1b in Excitatory Dorsal Horn Neuron Development, Spinofugal Connectivity, and Nociception». *Journal of Neuroscience* 35(13):5233-46. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4690-14.2015.
- Tahayori, Behdad, y David M. Kocaja. 2012. «Activity-Dependent Plasticity of Spinal Circuits in the Developing and Mature Spinal Cord». *Neural Plasticity* 2012:e964843. doi: 10.1155/2012/964843.
- Tan, Chun-Hsiang, y Peter A. McNaughton. 2016. «The TRPM2 Ion Channel Is Required for Sensitivity to Warmth». *Nature* 536(7617):460-63. doi: 10.1038/nature19074.
- Tang, Yi-Quan, Sol Ah Lee, Mizanur Rahman, Siva A. Vanapalli, Hang Lu, y William R. Schafer. 2020. «Ankyrin Is An Intracellular Tether for TMC Mechanotransduction Channels». *Neuron* 107(1):112-125.e10. doi: 10.1016/j.neuron.2020.03.026.
- Tanga, Flobert Y., Nancy Natile-McMenemy, y Joyce A. DeLeo. 2005. «The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(16):5856-61. doi: 10.1073/pnas.0501634102.
- Targowska-Duda, Katarzyna M., Darian Peters, Jason L. Marcus, Gilles Zribi, Lawrence Toll, y Akihiko Ozawa. 2024. «Functional and Anatomical Analyses of Active Spinal Circuits in a Mouse Model of Chronic Pain». *PAIN* 165(3):685. doi: 10.1097/j.pain.0000000000003068.
- Tashima, Ryoichi, Keisuke Koga, Misuzu Sekine, Kensho Kanehisa, Yuta Kohro, Keiko Tominaga, Katsuyuki Matsushita, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Yugo Fukazawa, Kazuhide Inoue, Hiromu Yawo, Hidemasa Furue, y Makoto Tsuda. 2018. «Optogenetic Activation of Non-Nociceptive A β Fibers Induces Neuropathic Pain-Like Sensory and Emotional Behaviors after Nerve Injury in Rats». *Eneuro* 5(1):ENEURO.0450-17.2018. doi: 10.1523/ENEURO.0450-17.2018.
- Tashima, Ryoichi, Keisuke Koga, Yu Yoshikawa, Misuzu Sekine, Moeka Watanabe, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Hidemasa Furue, Toshiharu Yasaka, y Makoto Tsuda. 2021. «A Subset of Spinal Dorsal Horn Interneurons Crucial for Gating Touch-Evoked Pain-like Behavior». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118(3):e2021220118. doi: 10.1073/pnas.2021220118.
- Tjølsen, Arne, Odd-Geir Berge, Steinar Hunskaar, Jan Henrik Rosland, y Kjell Hole. 1992. «The Formalin Test: An Evaluation of the Method». *Pain* 51(1):5-17. doi: 10.1016/0304-3959(92)90003-T.
- Todd, A. J., D. I. Hughes, E. Polgár, G. G. Nagy, M. Mackie, O. P. Ottersen, y D. J. Maxwell. 2003. «The Expression of Vesicular Glutamate Transporters VGLUT1 and VGLUT2 in Neurochemically Defined Axonal Populations in the Rat Spinal Cord with Emphasis on the Dorsal Horn». *The European Journal of Neuroscience* 17(1):13-27. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02406.x.
- Todd, A. J., R. C. Spike, S. Young, y Z. Puskár. 2005. «Fos Induction in Lamina I Projection Neurons in Response to Noxious Thermal Stimuli». *Neuroscience* 131(1):209-17. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.11.001.

- Todd, A. J., y A. C. Sullivan. 1990. «Light Microscope Study of the Coexistence of GABA-like and Glycine-like Immunoreactivities in the Spinal Cord of the Rat». *The Journal of Comparative Neurology* 296(3):496-505. doi: 10.1002/cne.902960312.
- Todd, Andrew J. 2010. «Neuronal Circuitry for Pain Processing in the Dorsal Horn». *Nature Reviews Neuroscience* 11(12):823-36. doi: 10.1038/nrn2947.
- Todd, Andrew J. 2017. «Identifying Functional Populations among the Interneurons in Laminae I-III of the Spinal Dorsal Horn». *Molecular Pain* 13:1744806917693003. doi: 10.1177/1744806917693003.
- Todd, Andrew J., Zita Puskár, Rosemary C. Spike, Catriona Hughes, Christine Watt, y Lisa Forrest. 2002. «Projection Neurons in Lamina I of Rat Spinal Cord with the Neurokinin 1 Receptor Are Selectively Innervated by Substance P-Containing Afferents and Respond to Noxious Stimulation». *Journal of Neuroscience* 22(10):4103-13. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-10-04103.2002.
- Treede, R. D., R. A. Meyer, S. N. Raja, y J. N. Campbell. 1995. «Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin.» *The Journal of Physiology* 483(Pt 3):747-58.
- Trevisani, Marcello, Jan Siemens, Serena Materazzi, Diana M. Bautista, Romina Nassini, Barbara Campi, Noritaka Imamachi, Eunice André, Riccardo Patacchini, Graeme S. Cottrell, Raffaele Gatti, Allan I. Basbaum, Nigel W. Bunnett, David Julius, y Pierangelo Geppetti. 2007. «4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(33):13519-24. doi: 10.1073/pnas.0705923104.
- Usoskin, Dmitry, Alessandro Furlan, Saiful Islam, Hind Abdo, Peter Lönnerberg, Daohua Lou, Jens Hjerling-Leffler, Jesper Haeggström, Olga Kharchenko, Peter V. Kharchenko, Sten Linnarsson, y Patrik Ernfors. 2015. «Unbiased Classification of Sensory Neuron Types by Large-Scale Single-Cell RNA Sequencing». *Nature Neuroscience* 18(1):145-53. doi: 10.1038/nn.3881.
- Valtschanoff, J. G., R. J. Weinberg, y A. Rustioni. 1992. «Peripheral Injury and Anterograde Transport of Wheat Germ Agglutinin-Horse Radish Peroxidase to the Spinal Cord». *Neuroscience* 50(3):685-96. doi: 10.1016/0306-4522(92)90457-d.
- Vandewauw, Ine, Katrien De Clercq, Marie Mulier, Katharina Held, Silvia Pinto, Nele Van Ranst, Andrei Segal, Thierry Voet, Rudi Vennekens, Katharina Zimmermann, Joris Vriens, y Thomas Voets. 2018. «A TRP Channel Trio Mediates Acute Noxious Heat Sensing». *Nature* 555(7698):662-66. doi: 10.1038/nature26137.
- Viana, Félix. 2016. «TRPA1 Channels: Molecular Sentinels of Cellular Stress and Tissue Damage». *The Journal of Physiology* 594(15):4151-69. doi: 10.1113/JP270935.
- Vilceanu, Daniel, y Cheryl L. Stucky. 2010. «TRPA1 Mediates Mechanical Currents in the Plasma Membrane of Mouse Sensory Neurons». *PLoS ONE* 5(8):e12177. doi: 10.1371/journal.pone.0012177.
- Virk, H. S., M. Z. Rekas, M. S. Biddle, A. K. A. Wright, J. Sousa, C. A. Weston, L. Chachi, K. M. Roach, y P. Bradding. 2019. «Validation of Antibodies for the Specific Detection of Human TRPA1». *Scientific Reports* 9(1):18500. doi: 10.1038/s41598-019-55133-7.

- Voskuil, JLA. 2014. «Commercial antibodies and their validation». *F1000Research* 3:232. doi: 10.12688/f1000research.4966.2.
- Vriens, Joris, Bernd Nilius, y Thomas Voets. 2014. «Peripheral Thermosensation in Mammals». *Nature Reviews Neuroscience* 15(9):573-89. doi: 10.1038/nrn3784.
- Vriens, Joris, Grzegorz Owsianik, Thomas Hofmann, Stephan E. Philipp, Julia Stab, Xiaodi Chen, Melissa Benoit, Fenqin Xue, Annelies Janssens, Sara Kerselaers, Johannes Oberwinkler, Rudi Vennekens, Thomas Gudermann, Bernd Nilius, y Thomas Voets. 2011. «TRPM3 Is a Nociceptor Channel Involved in the Detection of Noxious Heat». *Neuron* 70(3):482-94. doi: 10.1016/j.neuron.2011.02.051.
- Vulchanova, L., M. S. Riedl, S. J. Shuster, G. Buell, A. Surprenant, R. A. North, y R. Elde. 1997. «Immunohistochemical Study of the P2X2 and P2X3 Receptor Subunits in Rat and Monkey Sensory Neurons and Their Central Terminals». *Neuropharmacology* 36(9):1229-42. doi: 10.1016/S0028-3908(97)00126-3.
- Wang, Changming, Leying Gu, Yonglan Ruan, Xiao Geng, Miao Xu, Niuniu Yang, Lei Yu, Yucui Jiang, Chan Zhu, Yan Yang, Yuan Zhou, Xiaowei Guan, Wenqin Luo, Qin Liu, Xinzhong Dong, Guang Yu, Lei Lan, y Zongxiang Tang. 2019. «Facilitation of MrgprD by TRP-A1 promotes neuropathic pain». *The FASEB Journal* 33(1):1360-73. doi: 10.1096/fj.201800615RR.
- Wang, Hong, y Mark J. Zylka. 2009. «Mrgprd-Expressing Polymodal Nociceptive Neurons Innervate Most Known Classes of Substantia Gelatinosa Neurons». *Journal of Neuroscience* 29(42):13202-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3248-09.2009.
- Wang, Hongsheng, Wenbing Chen, Zhaoqi Dong, Guanglin Xing, Wanpeng Cui, Lingling Yao, Wen-Jun Zou, Heath L. Robinson, Yaoyao Bian, Zhipeng Liu, Kai Zhao, Bin Luo, Nannan Gao, Hongsheng Zhang, Xiao Ren, Zheng Yu, James Meixiong, Wen-Cheng Xiong, y Lin Mei. 2022. «A Novel Spinal Neuron Connection for Heat Sensation». *Neuron* 110(14):2315-2333.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2022.04.021.
- Wang, Liang-Biao, Xiao-Jing Su, Qiao-Feng Wu, Xiang Xu, Xin-Yue Wang, Mo Chen, Jia-Reng Ye, Abasi Maimaitiabula, Xiao-Qing Liu, Wen Sun, y Yan Zhang. 2022. «Parallel Spinal Pathways for Transmitting Reflexive and Affective Dimensions of Nocifensive Behaviors Evoked by Selective Activation of the Mas-Related G Protein-Coupled Receptor D-Positive and Transient Receptor Potential Vanilloid 1-Positive Subsets of Nociceptors». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 16:910670. doi: 10.3389/fncel.2022.910670.
- Wang, Yoko B., Guillaume de Lartigue, y Amanda J. Page. 2020. «Dissecting the Role of Subtypes of Gastrointestinal Vagal Afferents». *Frontiers in Physiology* 11.
- Wang, Yu-ting, Kai Lu, Dan-dan Yao, Shu-xia Zhang, y Gang Chen. 2023. «Anti-Inflammatory and Analgesic Effect of Forsythiaside B on Complete Freund's Adjuvant-Induced Inflammatory Pain in Mice». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 645:55-60. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.01.036.
- Warwick, Charles, Colleen Cassidy, Junichi Hachisuka, Margaret C. Wright, Kyle M. Baumbauer, Peter C. Adelman, Kuan H. Lee, Kelly M. Smith, Tayler D. Sheahan, Sarah E. Ross, y H. Richard Koerber. 2021. «MrgprdCre Lineage Neurons Mediate Optogenetic Allodynia through an Emergent Polysynaptic Circuit». *Pain* 162(7):2120-31. doi: 10.1097/j.pain.0000000000002227.

- Watanabe, Yoshinori, Randall S. Johnson, Linda S. Butler, Devin K. Binder, Bruce M. Spiegelman, Virginia E. Papaioannou, y James O. McNamara. 1996. «Null Mutation of c-fos Impairs Structural and Functional Plasticities in the Kindling Model of Epilepsy». *The Journal of Neuroscience* 16(12):3827-36. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-12-03827.1996.
- Watson, Charles, y Gulgun Kayalioglu. 2009. «The Organization of the Spinal Cord». Pp. 1-7 en *The Spinal Cord*. Elsevier.
- Watson, Charles, George Paxinos, Gulgun Kayalioglu, y Claire Heise. 2009. «Atlas of the Mouse Spinal Cord». Pp. 308-79 en *The Spinal Cord*. Elsevier.
- Wei, Hong, Ari Koivisto, Marja Saarnilehto, Hugh Chapman, Katja Kuokkanen, Bin Hao, Jin-Lu Huang, Yong-Xiang Wang, y Antti Pertovaara. 2011. «Spinal Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Contributes to Central Pain Hypersensitivity in Various Pathophysiological Conditions in the Rat». *Pain* 152(3):582-91. doi: 10.1016/j.pain.2010.11.031.
- Weidner, C., D. Miceli, y J. Repe´rant. 1983. «Orthograde axonal and transcellular transport of different fluorescent tracers in the primary visual system of the rat». *Brain Research* 272(1):129-36. doi: 10.1016/0006-8993(83)90369-4.
- Weng, H. R., J. H. Chen, y J. P. Cata. 2006. «Inhibition of Glutamate Uptake in the Spinal Cord Induces Hyperalgesia and Increased Responses of Spinal Dorsal Horn Neurons to Peripheral Afferent Stimulation». *Neuroscience* 138(4):1351-60. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.11.061.
- Wercberger, Racheli, y Allan I. Basbaum. 2019. «Spinal cord projection neurons: a superficial, and also deep, analysis». *Current opinion in physiology* 11:109-15. doi: 10.1016/j.cophys.2019.10.002.
- Wercberger, Racheli, Joao M. Braz, Jarret A. Weinrich, y Allan I. Basbaum. 2021. «Pain and itch processing by subpopulations of molecularly diverse spinal and trigeminal projection neurons». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118(28):e2105732118. doi: 10.1073/pnas.2105732118.
- Woolf, C. J., B. Safieh-Garabedian, Q. P. Ma, P. Crilly, y J. Winter. 1994. «Nerve Growth Factor Contributes to the Generation of Inflammatory Sensory Hypersensitivity». *Neuroscience* 62(2):327-31. doi: 10.1016/0306-4522(94)90366-2.
- Woolf, Clifford J. 2010. «What Is This Thing Called Pain?» *The Journal of Clinical Investigation* 120(11):3742-44. doi: 10.1172/JCI45178.
- Woolf, Clifford J. 2011. «Central Sensitization: Implications for the Diagnosis and Treatment of Pain». *Pain* 152(3):S2-15. doi: 10.1016/j.pain.2010.09.030.
- Woolf, Clifford J., y Qiufu Ma. 2007. «Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors». *Neuron* 55(3):353-64. doi: 10.1016/j.neuron.2007.07.016.
- Woolf, Clifford J., y Stephen W. N. Thompson. 1991. «The Induction and Maintenance of Central Sensitization Is Dependent on N-Methyl-d-Aspartic Acid Receptor Activation; Implications for the Treatment of Post-Injury Pain Hypersensitivity States». *PAIN* 44(3):293. doi: 10.1016/0304-3959(91)90100-C.

- Xiao, Bailong, Bertrand Coste, Jayanti Mathur, y Ardem Patapoutian. 2011. «Temperature-dependent STIM1 activation induces Ca²⁺ influx and modulates gene expression». *Nature chemical biology* 7(6):351-58. doi: 10.1038/nchembio.558.
- Xu, Guang-Yin, y Li-Yen Mae Huang. 2002. «Peripheral Inflammation Sensitizes P2X Receptor-Mediated Responses in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons». *Journal of Neuroscience* 22(1):93-102. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-01-00093.2002.
- Xu, Ya, Yanping Gu, Ping Wu, Guang-Wen Li, y Li-Yen Mae Huang. 2003. «Efficiencies of Transgene Expression in Nociceptive Neurons Through Different Routes of Delivery of Adeno-Associated Viral Vectors». *Human Gene Therapy* 14(9):897-906. doi: 10.1089/104303403765701187.
- Yadav, Archana, Kaya J. E. Matson, Li Li, Isabelle Hua, Joana Petrescu, Kristy Kang, Mor R. Alkaslasi, Dylan I. Lee, Saadia Hasan, Ahmad Galuta, Annemarie Dedek, Sara Ameri, Jessica Parnell, Mohammad M. Alshardan, Feras Abbas Qumqumji, Saud M. Alhamad, Alick Pingbei Wang, Gaetan Poulen, Nicolas Lonjon, Florence Vachiere-Lahaye, Pallavi Gaur, Mike A. Nalls, Yue A. Qi, Dragan Maric, Michael E. Ward, Michael E. Hildebrand, Pierre-Francois Mery, Emmanuel Bourinet, Luc Bauchet, Eve C. Tsai, Hemali Phatnani, Claire E. Le Pichon, Vilas Menon, y Ariel J. Levine. 2023. «A Cellular Taxonomy of the Adult Human Spinal Cord». *Neuron* 111(3):328-344.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2023.01.007.
- Yajima, Takehiro, Tadasu Sato, Hiroshi Hosokawa, Teruyoshi Kondo, y Hiroyuki Ichikawa. 2022. «Transient Receptor Potential Melastatin-7 in the Rat Dorsal Root Ganglion». *Journal of Chemical Neuroanatomy* 125:102163. doi: 10.1016/j.jchemneu.2022.102163.
- Yarmolinsky, David A., Yueqing Peng, Leah A. Pogorzala, Michael Rutlin, Mark A. Hoon, y Charles S. Zuker. 2016. «Coding and Plasticity in the Mammalian Thermosensory System». *Neuron* 92(5):1079-92. doi: 10.1016/j.neuron.2016.10.021.
- Yasaka, Toshiharu, Sheena Y. X. Tiong, David I. Hughes, John S. Riddell, y Andrew J. Todd. 2010. «Populations of Inhibitory and Excitatory Interneurons in Lamina II of the Adult Rat Spinal Dorsal Horn Revealed by a Combined Electrophysiological and Anatomical Approach». *Pain* 151(2):475-88. doi: 10.1016/j.pain.2010.08.008.
- Yin, Dong-Min, Xiang-Dong Sun, Jonathan C. Bean, Thiri W. Lin, Anupama Sathiyamurthy, Wen-Cheng Xiong, Tian-Ming Gao, Yong-Jun Chen, y Lin Mei. 2013. «Regulation of Spine Formation by ErbB4 in PV-Positive Interneurons». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 33(49):19295-303. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2090-13.2013.
- Yizhar, Ofer, Lief E. Fenno, Thomas J. Davidson, Murtaza Mogri, y Karl Deisseroth. 2011. «Optogenetics in Neural Systems». *Neuron* 71(1):9-34. doi: 10.1016/j.neuron.2011.06.004.
- Young, R. L., N. J. Cooper, y L. A. Blackshaw. 2008. «Chemical Coding and Central Projections of Gastric Vagal Afferent Neurons». *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 20(6):708-18. doi: 10.1111/j.1365-2982.2007.01071.x.

- Yu, Yingying, Guohua Wei, Qi Zhou, y Huanhuan Sha. 2021. «ErbB4 in Spinal PV Interneurons Regulates Mechanical Allodynia in Neuropathic Pain via Modulation of Glycinergic Inhibitory Tone». *Journal of Pain Research* 14:1643-51. doi: 10.2147/JPR.S311894.
- Zappia, Katherine J., Crystal L. O'Hara, Francie Moehring, Kelvin Y. Kwan, y Cheryl L. Stucky. 2017. «Sensory Neuron-Specific Deletion of TRPA1 Results in Mechanical Cutaneous Sensory Deficits». *eNeuro* 4(1). doi: 10.1523/ENEURO.0069-16.2017.
- Zeilhofer, Hanns Ulrich, Hendrik Wildner, y Gonzalo E. Yevenes. 2012. «Fast Synaptic Inhibition in Spinal Sensory Processing and Pain Control». *Physiological reviews* 92(1):193-235. doi: 10.1152/physrev.00043.2010.
- Zhang, Donghang, Yali Chen, Yiyong Wei, Hongjun Chen, Yujie Wu, Lin Wu, Jin Li, Qiyang Ren, Changhong Miao, Tao Zhu, Jin Liu, Bowen Ke, y Cheng Zhou. 2024. «Spatial transcriptomics and single-nucleus RNA sequencing reveal a transcriptomic atlas of adult human spinal cord» editado por J. Choi y M. Choi. *eLife* 12:RP92046. doi: 10.7554/eLife.92046.
- Zhang, Jie, Daniel J. Cavanaugh, Michael I. Nemenov, y Allan I. Basbaum. 2013. «The Modality-Specific Contribution of Peptidergic and Non-Peptidergic Nociceptors Is Manifest at the Level of Dorsal Horn Nociceptive Neurons: Modality-Specific Nociceptor Contributions to Dorsal Horn Physiology». *The Journal of Physiology* 591(4):1097-1110. doi: 10.1113/jphysiol.2012.242115.
- Zhang, Lei, Sarah Louise Jones, Kate Brody, Marcello Costa, y Simon J. H. Brookes. 2004. «Thermosensitive Transient Receptor Potential Channels in Vagal Afferent Neurons of the Mouse». *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 286(6):G983-991. doi: 10.1152/ajpgi.00441.2003.
- Zhang, Yan-Ping, y Thomas G. Oertner. 2007. «Optical Induction of Synaptic Plasticity Using a Light-Sensitive Channel». *Nature Methods* 4(2):139-41. doi: 10.1038/nmeth988.
- Zhao, Chen, Clemens Ries, Ying Du, Jingwei Zhang, Kenji Sakimura, Keiichi Itoi, y Jan M. Deussing. 2023. «Differential CRH Expression Level Determines Efficiency of Cre- and Flp-Dependent Recombination». *Frontiers in Neuroscience* 17:1163462. doi: 10.3389/fnins.2023.1163462.
- Zhao, Xiao-Hui, Ting Zhang, y Yun-Qing Li. 2015. «The Up-Regulation of Spinal Toll-like Receptor 4 in Rats with Inflammatory Pain Induced by Complete Freund's Adjuvant». *Brain Research Bulletin* 111:97-103. doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.01.002.
- Zhi, Yu-Ru, Feng Cao, Xiao-Jing Su, Shu-Wen Gao, Hao-Nan Zheng, Jin-Yan Jiang, Li Su, Jiao Liu, Yun Wang, Yan Zhang, y Ying Zhang. 2022. «The T-Type Calcium Channel Cav3.2 in Somatostatin Interneurons in Spinal Dorsal Horn Participates in Mechanosensation and Mechanical Allodynia in Mice». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 16:875726. doi: 10.3389/fncel.2022.875726.
- Zong, Gang-Fan, Rui Deng, Su-Yun Yu, Ai-Yun Wang, Zhong-Hong Wei, Yang Zhao, y Yin Lu. 2022. «Thermo-Transient Receptor Potential Channels: Therapeutic Potential in Gastric Cancer». *International Journal of Molecular Sciences* 23(23):15289. doi: 10.3390/ijms232315289.

- Zylka, Mark J., Xinzhong Dong, Amber L. Southwell, y David J. Anderson. 2003. «Atypical expansion in mice of the sensory neuron-specific Mrg G protein-coupled receptor family». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(17):10043-48. doi: 10.1073/pnas.1732949100.
- Zylka, Mark J., Frank L. Rice, y David J. Anderson. 2005. «Topographically Distinct Epidermal Nociceptive Circuits Revealed by Axonal Tracers Targeted to Mrgprd». *Neuron* 45(1):17-25. doi: 10.1016/j.neuron.2004.12.015.







8. ANEXO: PUBLICACIÓN





Article

Validation of Six Commercial Antibodies for the Detection of Heterologous and Endogenous TRPM8 Ion Channel Expression

Pablo Hernández-Ortego, Remedios Torres-Montero, Elvira de la Peña, Félix Viana *  and Jorge Fernández-Trillo *

Instituto de Neurociencias (IN), CSIC-UMH, 03550 San Juan de Alicante, Spain

* Correspondence: felix.viana@umh.es (F.V.); jorge.fernandezt@umh.es (J.F.-T.)

Abstract: TRPM8 is a non-selective cation channel expressed in primary sensory neurons and other tissues, including the prostate and urothelium. Its participation in different physiological and pathological processes such as thermoregulation, pain, itch, inflammation and cancer has been widely described, making it a promising target for therapeutic approaches. The detection and quantification of TRPM8 seems crucial for advancing the knowledge of the mechanisms underlying its role in these pathophysiological conditions. Antibody-based techniques are commonly used for protein detection and quantification, although their performance with many ion channels, including TRPM8, is suboptimal. Thus, the search for reliable antibodies is of utmost importance. In this study, we characterized the performance of six TRPM8 commercial antibodies in three immunodetection techniques: Western blot, immunocytochemistry and immunohistochemistry. Different outcomes were obtained for the tested antibodies; two of them proved to be successful in detecting TRPM8 in the three approaches while, in the conditions tested, the other four were acceptable only for specific techniques. Considering our results, we offer some insight into the usefulness of these antibodies for the detection of TRPM8 depending on the methodology of choice.

Keywords: TRPM8; Western blot; immunocytochemistry; immunohistochemistry



Citation: Hernández-Ortego, P.; Torres-Montero, R.; de la Peña, E.; Viana, F.; Fernández-Trillo, J. Validation of Six Commercial Antibodies for the Detection of Heterologous and Endogenous TRPM8 Ion Channel Expression. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 16164. <https://doi.org/10.3390/ijms232416164>

Academic Editors: Árpád Szállási and Ari-Pekka Koivisto

Received: 30 November 2022

Accepted: 15 December 2022

Published: 18 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The detection of environmental temperatures is one of the critical functions of the somatosensory system. Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) is a non-selective cation channel that permeates divalent (Ca^{2+}) and monovalent (Na^+ , K^+) cations [1,2]. It is a polymodal channel that can integrate different physical and chemical stimuli, being activated by mild cold and different natural and synthetic cooling compounds such as menthol, WS-12 [3] and icilin [4]. In addition, its activity is modulated by intracellular signaling molecules such as Ca^{2+} and PIP_2 [5–7].

TRPM8 is preferentially expressed in A δ and C-fibers innervating the skin where it acts as a mild cold temperature transducer [8]. The depolarization of cold thermoreceptor endings generates trains of action potentials that travel from the periphery towards the cell body in the dorsal root (DRG) or trigeminal ganglia (TG), connecting with dorsal horn interneurons and to other brain regions (e.g., hypothalamus, cortex) where ultimately cold perception occurs and behavioral and autonomic thermoregulatory responses are triggered.

TRPM8 is also expressed in other surface tissues such as the cornea, where it participates in the regulation of the humidity of the eye surface by the detection of the tear osmolality. The activation of corneal TRPM8+ endings triggers basal tearing and blinking, and its malfunction is implicated in the mechanisms of dry eye disease (DED) [9–13].

The expression of TRPM8 has also been described in tissues that are not exposed to the environment such as the brown adipose tissue where it has a role in thermogenesis and high-fat diet-induced obesity [14], intestinal epithelium associated with irritable bowel syndrome (IBS) and colitis [15–17], and the bladder associated with cooling-reflex, urinary urgency, overactive bladder and painful bladder syndrome [18–21]. Recently, TRPM8

expression has been detected in some brain regions (hypothalamus, septum, thalamus) and the retina, suggesting a role of this channel in thermal regulation and circadian control [22,23]. Additionally, TRPM8 is also expressed in prostate cancer cells. Some studies suggest a role of this channel in cell proliferation, whereas other findings suggest its participation in the reduction in metastatic processes in the prostate [24].

The important physiological role of TRPM8, as well as its involvement in different pathophysiological conditions (prostate cancer, migraine, obesity, cold pain, itch, inflammation), makes this channel an important target for different studies. Currently, multiple techniques are routinely used to assess TRPM8 function. They include electrophysiological recordings and calcium imaging. Various mouse models are also available, including reporter and KO mice. In particular, reporter mice have been extremely useful in characterizing the expression pattern of TRPM8 in the mouse peripheral and central nervous system [22,25,26]. These studies, together with previous *in situ* hybridization techniques [27], indicate that TRPM8 is expressed in a small subpopulation of adult TG and DRG sensory neurons, and shows a restricted expression in the brain as well. In other species, the lack of reporter animals obliges the use of alternative techniques, such as immunofluorescence and Western blot (WB), to quantify TRPM8 expression.

However, while immunofluorescence and WB are antibody-based mainstream techniques for protein visualization and quantification, the use of antibodies to characterize the expression of TRPM8 and other TRP channels remains problematic [28]. There are many commercially available antibodies but their performance in different techniques such as WB, immunocytochemistry (ICC) and immunohistochemistry (IHC) varies from acceptable to very poor, with many antibodies showing low specificity. To our knowledge, no systematic profiling of commercial antibodies against TRPM8 has been reported so far. Here, we validated six commercial TRPM8 antibodies for their use in WB, ICC and IHC, using different methodologies and following standard procedures. First, mouse TRPM8 fused to the fluorescent protein EYFP (mTRPM8-EYFP) was expressed in HEK-293 cells. ICC was performed in fixed cells testing the performance of the antibodies under TRPM8 overexpression conditions. In parallel, cell lysates were subjected to WB analysis with each of the tested antibodies using manufacturer-recommended dilutions. Finally, the antibodies were tested against native TRPM8, using DRG sensory neurons from a transgenic mouse line that specifically labels TRPM8⁺ neurons with EYFP. To confirm their specificity, the antibodies that performed best in DRG ICC and IHC were further validated using a TRPM8 KO mouse.

2. Results

Six commercially available antibodies against TRPM8 were characterized in this study and summarized in Table 2 in the Material and Methods Section. At present, five of them are still available, and one has been discontinued (Origene1). All antibodies were designed against human TRPM8 but have reported cross-species reactivity with mouse and rat. As detailed in Table 2, two antibodies were polyclonal and four were monoclonal. The majority are directed against the extracellular domains of TRPM8 (although the exact region was only provided for Alomone) while Origene2 epitope is located in the N-terminal domain.

2.1. All Tested Antibodies Specifically Label Mouse TRPM8 Overexpressed in HEK-293 Cells

Cultured HEK-293 cells transfected with mTRPM8-EYFP were used to assess the suitability of each antibody in detecting overexpressed mTRPM8 by immunocytochemistry (ICC). EYFP fluorescence was used to identify transfected cells expressing TRPM8. First of all, using calcium imaging, we confirmed that EYFP⁺ HEK-293 cells responded to TRPM8 agonists such as mild cold stimuli (~18–20 °C) and 10 µM WS-12, while EYFP[−] cells did not (Figure 1). Only cells that responded to 50 µM Carbachol, a compound that activates endogenous muscarinic receptors in HEK-293 cells [29], were included in the analysis.

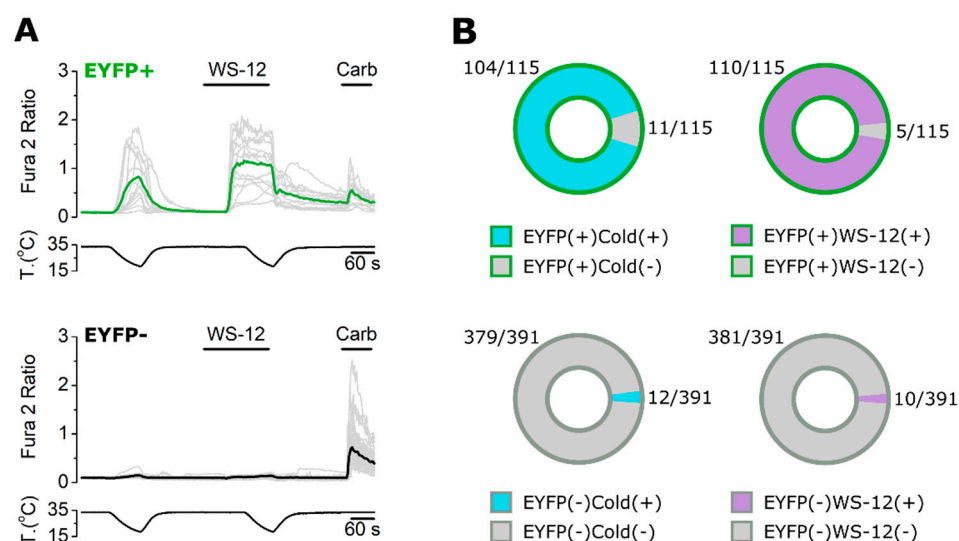


Figure 1. Calcium imaging in HEK-293 cells transiently overexpressing mTRPM8-EYFP. **(A)** Representative traces of calcium transients evoked by mild cold (~ 18 – 20 °C), WS-12 ($10\ \mu\text{M}$) and Carbachol ($50\ \mu\text{M}$) in both EYFP+ and EYFP– cells. Traces corresponding to individual cells are shown in grey. Colored traces represent averages of the respective individual traces. **(B)** Proportion of EYFP+ and EYFP– cells responding to cold and WS-12. $n = 506$ cells; 2 independent experiments.

For mTRPM8 detection in ICC, we used two dilutions of each antibody in the range recommended by the vendors (1:500 or 1:200). All antibodies showed a clear co-localization of EYFP and mTRPM8 immunostaining (Figure 2A–F), indicating that the six antibodies are successfully detecting high levels of mTRPM8 protein. Notice the fluorescence punctate pattern typical of TRPM8 overexpression [30–32], both for the EYFP and antibody signal, further confirming antibody specificity (Figure S1). No TRPM8 immunostaining was found in neighboring EYFP– (i.e., non-transfected) cells, showing that none of the antibodies displayed any confounding unspecific staining. To compare the performance of the different antibodies, a specificity ratio (SR) (see Methods) was calculated for each dilution (Figure 2A–F, box plots). In general, the SR was similar with both dilutions or higher with 1:200 (ECM2 and Origene2), with the exception of ECM1, in which the higher dilution (1:500) showed a higher SR. In other words, ECM1 seems to work better when more diluted.

As shown in Figure 2G, the six antibodies have an SR significantly higher than the corresponding control without primary antibody ($\text{SR} > 1$, meaning that the antibody fluorescence signal is higher for TRPM8+ than for TRPM8– cells). However, SRs calculated using ECM1 and Origene1 were almost two-fold higher than with the other antibodies.

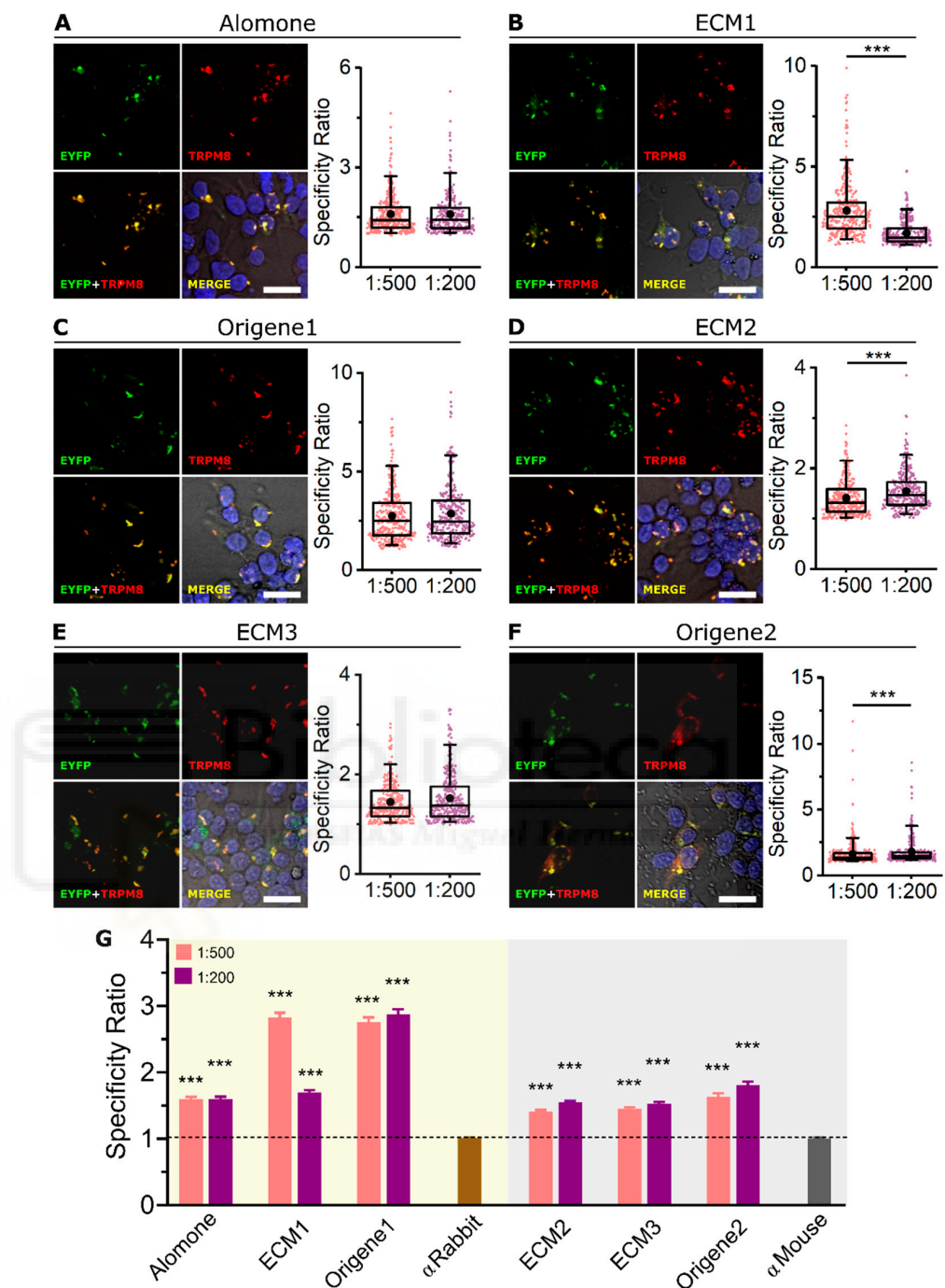


Figure 2. Immunocytochemistry of mTRPM8 in transfected HEK-293 cells. (A–F left) Confocal images of mTRPM8-EYFP transiently expressed in HEK-293 cells. EYFP (green), TRPM8 antibody (red) and Hoechst staining (blue). Merge images correspond to the overlap of the three fluorescent signals plus the bright field image. Scale bar: 30 μ m. (A–F right) Box plots represent the specificity ratio (SR) for each dilution of the respective antibody. Each dot corresponds to an individual EYFP+ cell. Box contains the 25th to 75th percentiles. Whiskers mark the 5th and 95th percentiles. The line inside the box denotes the median and the black dot represents the mean. (***) $p < 0.001$, Mann–Whitney test). (G) Bar histogram summarizing the SR mean $\pm$ SEM of each TRPM8 antibody and the controls without primary antibody (α Rabbit or α Mouse secondary antibodies alone). Dashed line indicates SR = 1. (***) $p < 0.001$, Kruskal–Wallis followed by Dunn’s post hoc test vs. α Rabbit or α Mouse). For each antibody and dilution, $n > 270$ cells; 4 fields from 2 independent transfections.

2.2. Not All Antibodies Detect mTRPM8 in Western Blotting

Cell lysates from HEK-293 cells transfected with mTRPM8-EYFP were used to examine whether the mentioned antibodies were able to detect mTRPM8 in Western blot (WB) (Figure 3A–F). A band with a molecular size around 160 kDa (black arrowheads), corresponding to the expected size of mTRPM8-EYFP, was detected by ECM1, Origene1 and Origene2. However, this band was not detected by Alomone, ECM2 or ECM3, even though EYFP immunoblotting revealed the presence of mTRPM8-EYFP in the sample (green arrowheads).

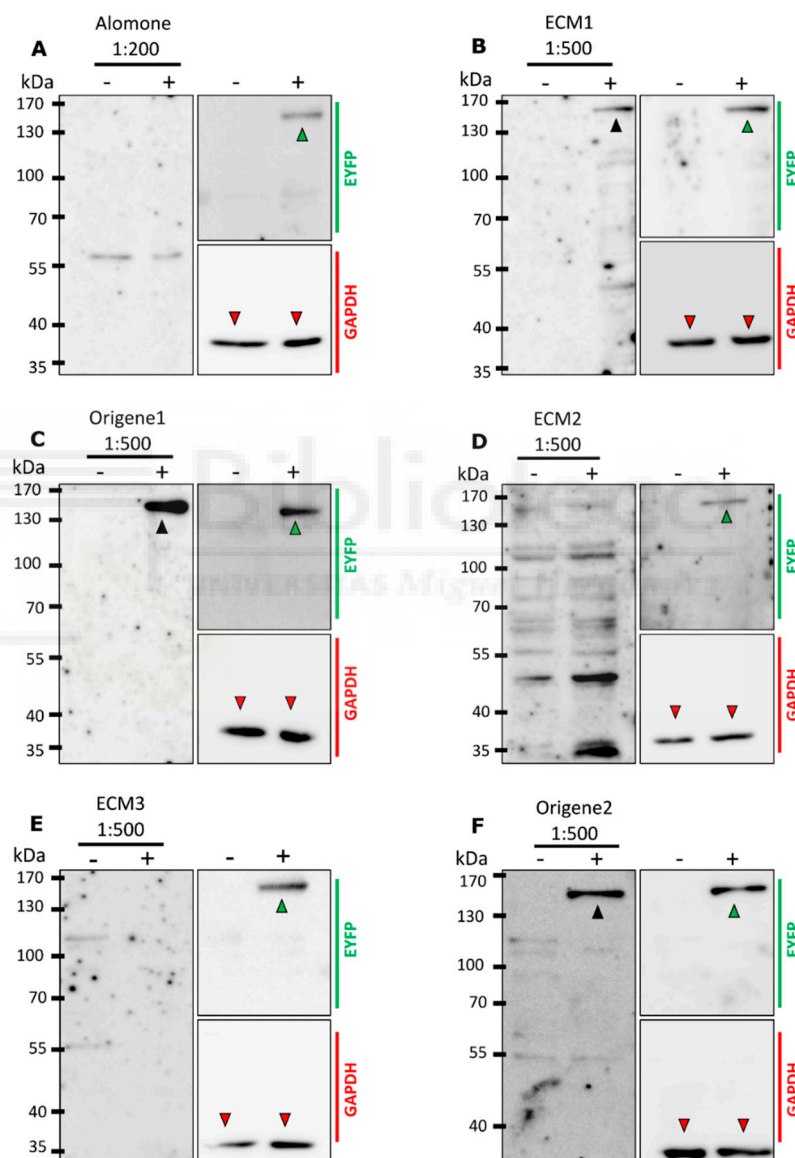


Figure 3. Western blot analysis for TRPM8 antibodies specificity. (A–F) TRPM8 immunoblots using (A) Alomone (B) ECM1, (C) Origene1, (D) ECM2, (E) ECM3 or (F) Origene2 antibodies. (–) lanes: untransfected HEK-293 cells, (+) lanes: HEK-293 cells transfected with mTRPM8-EYFP. Left: Immunoblot with each TRPM8 antibody. Right-top: EYFP immunoblotting on the same membrane. Right-bottom: GAPDH loading control. Black arrowheads indicate mTRPM8-EYFP bands revealed with anti-TRPM8 antibody. Green arrowheads indicate mTRPM8-EYFP bands revealed with anti-GFP antibody. Red arrowheads indicate GAPDH bands. All blots were repeated at least 3 times to exclude a technical artefact when no anti-TRPM8 signal was observed. For each replicate, the same lysate was used for all antibodies.

2.3. ECM1 and Origene1 Specifically Stain Endogenous TRPM8 in Mouse Dorsal Root Ganglion Sensory Neurons

The specificity of the six antibodies against endogenously expressed TRPM8 was assessed by ICC and immunohistochemistry (IHC) in mouse dorsal root ganglion (DRG) neurons. These cells are first order sensory neurons that respond to diverse stimuli and include a subpopulation expressing TRPM8 that are activated by mild-cold and WS-12. In order to identify TRPM8+ neurons, we used a transgenic mouse line that expresses EYFP under the TRPM8 promoter (*Trpm8^{BAC}-EYFP*). Note that in this case, EYFP is distributed freely in the cytoplasm and is not indicative of TRPM8 subcellular localization (Figure S1). Previous functional studies [33] indicated that, in this mouse line, EYFP expression is a good proxy of TRPM8 expression. Here, we confirmed the suitability of this reporter mouse to identify TRPM8-expressing neurons. Using cellular calcium imaging (Figure 4A,B), we found that the majority of cultured DRG cells with a strong EYFP signal responded to mild cold (~18–20 °C) and 10 μM WS-12 (100% and 92.3%, respectively) while only a few non-EYFP+ cells responded (2.37% and 1.05%, respectively). Only cells responding to high KCl (30 mM) were analyzed.

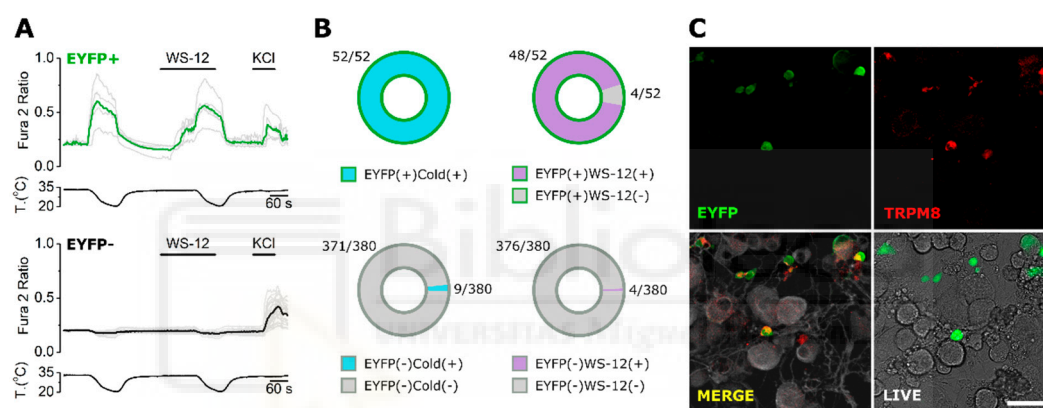


Figure 4. Calcium imaging in DRG cultured cells from *Trpm8^{BAC}-EYFP* mice. (A) Representative traces of calcium transients evoked by mild cold (~18–20 °C), WS-12 (10 μM) and KCl (30 mM) in EYFP+ and EYFP- neurons. Traces corresponding to individual cells are shown in grey. Colored traces represent averages of the respective individual traces. (B) Proportion of EYFP+ and EYFP- cells responding to cold and WS-12. (C) Representative immunocytochemistry performed after a calcium recording. Upper- and bottom-left: confocal images of the immunofluorescence. Green: EYFP. Red: TRPM8 (ECM1 antibody). Grey: β -tubulin. Bottom-right: transmitted light and EYFP fluorescence from the same live cells before fixation. n = 432 cells from 2 mice. Scale bar: 50 μm.

All six antibodies were tested for ICC on cultured DRG sensory neurons from *Trpm8^{BAC}-EYFP* mice. Two recommended antibody dilutions (1:500 and 1:200) were used. Only two of the six antibodies performed well; the ECM1 and Origene1 antibodies stained specifically the EYFP+ cold responsive cells (Figures 4C and 5B,C), showing no clear signal in EYFP- neurons, and displayed an SR > 1 (Figure 5B,C,G). In our conditions, the other four antibodies performed poorly. Alomone stained almost all sensory neurons (whether EYFP+ or EYFP- (Figure 5A), which is inconsistent with the restricted expression of TRPM8. In contrast, ECM2 did not label any cell (Figure 5D). ECM3 stained some cells, but it was not specific for EYFP+ neurons (Figure 5E). Origene2 seemed to mark EYFP+ cells with more intensity than EYFP- but showed some unspecific staining as well (Figure 5F).

The antibody concentrations used did not seem to have an important effect in their SR, with the exception of Alomone and ECM1, which showed a higher SR with 1:500 dilution (Figure 5A–F, box plots). Comparing the SR of each antibody versus the control (no primary antibody) (Figure 5G), we observed that ECM1 and Origene1 have a substantially

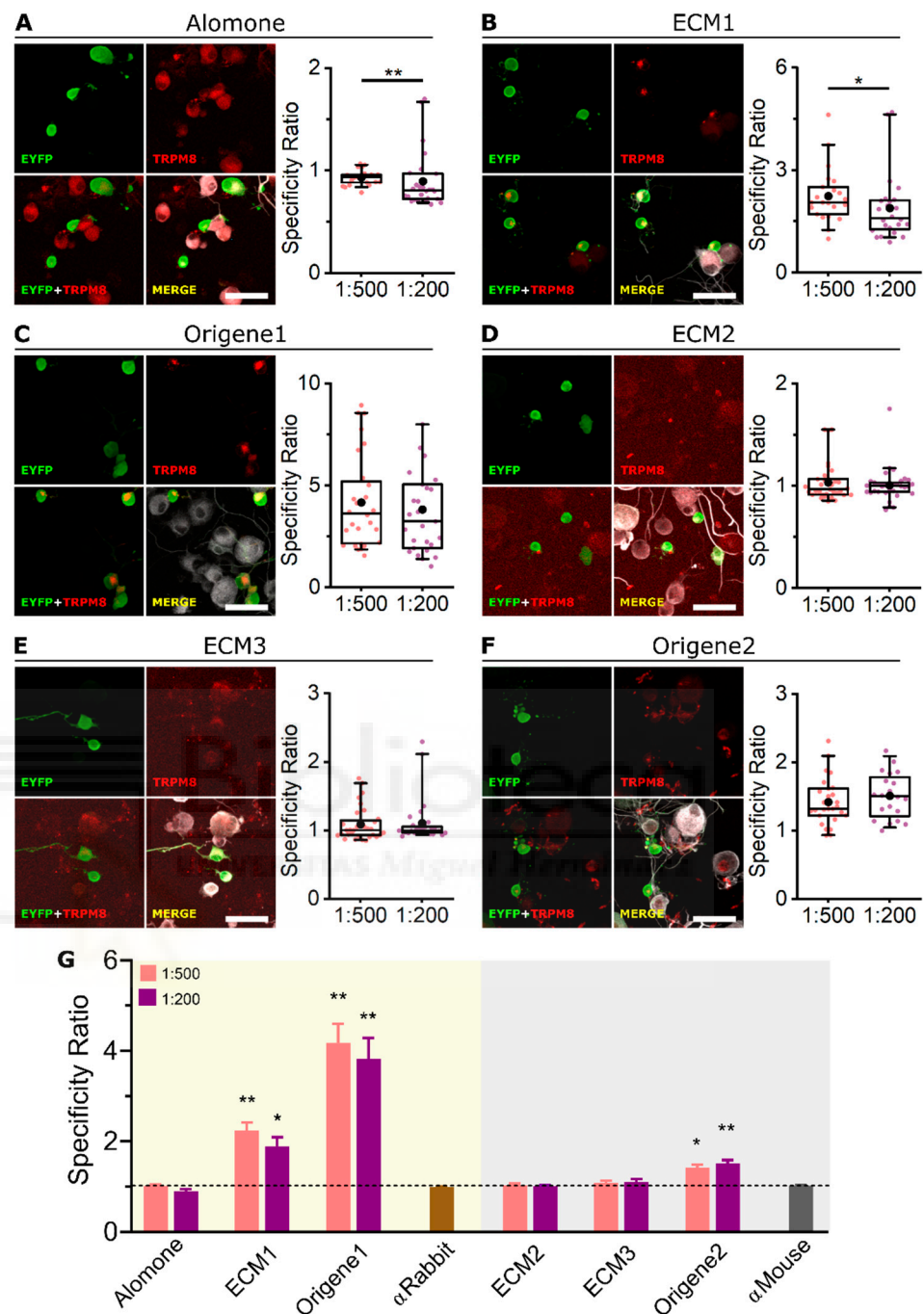


Figure 5. Immunocytochemistry of endogenous TRPM8 in cultured DRG cells from the *Trpm8^{BAC}*-EYFP⁺ mouse. (A–F left) Confocal images of TRPM8⁺ sensory neurons. EYFP (green), TRPM8 antibody (red) and β III-Tubulin (grey). Scale bar: 50 μ m. (A–F right) Box plots represent specificity ratio (SR) for each dilution of the respective antibody. Each dot corresponds to an individual EYFP⁺ cell. Box contains the 25th to 75th percentiles. Whiskers mark the 5th and 95th percentiles. The line inside the box denotes the median and the black dot represents the mean (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Mann–Whitney test). (G) Bar histogram summarizing the SR mean $\pm$ SEM of each TRPM8 antibody and the controls without primary antibody (α Rabbit or α Mouse secondary antibodies alone). Dashed line indicates SR = 1 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Kruskal–Wallis followed by Dunn’s post hoc test vs. α Rabbit or α Mouse). n = at least 20 cells; 4 pictures from 2 mice for each antibody and dilution.

The antibody concentrations used did not seem to have an important effect in their SR, with the exception of Alomone and ECM1, which showed a higher SR with 1:500 dilution (Figure 5A–F, box plots). Comparing the SR of each antibody versus the control (no primary antibody) (Figure 5G), we observed that ECM1 and Origene1 have a substantially higher ratio, suggesting good specificity. Origene2 SR is slightly higher than the control, indicating that this antibody also shows some specificity for TRPM8 in the conditions used.

Endogenous protein expression is more commonly assessed with IHC than with ICC, as the sample is more easily acquired and the tissue structure is preserved. However, other challenges arise such as epitope accessibility and masking [34,35]. We tested all six antibodies in the IHC of mouse DRG slices. Initially, citrate antigen retrieval was used, but neither antibody worked properly; subsequent IHCs were performed in the absence of antigen retrieval. The same two dilutions (1:500 and 1:200) were used, without any significant difference in the SR between them (Figure 6A–F, box plots). Similar to the ICCs, only ECM1 and Origene1 showed staining restricted to the bright EYFP+ neurons and distinguishable from the unspecific signal (Figure 6B,C). Alike the ICC results, Alomone marked all cells unspecifically (Figure 6A), and ECM2 and ECM3 produced an unspecific staining pattern similar to the staining observed in the secondary antibody alone (Figures 6D,E and S2). In addition, some EYFP– cells were strongly labelled after ECM2 incubation. With Origene2, the EYFP+ cells were immunostained, but a fraction of the EYFP– cells was also unspecifically labeled.

The SR comparison among the different antibodies is shown in Figure 6G: only ECM1 (1:200 dilution) and Origene1 have an SR different from the control without primary antibody.

2.4. KO Validation of TRPM8 Antibody Specificity in KO Animals

Knockout cells provide the best negative control in antibody validation [36]. Both the ICC and IHC results suggest that only the ECM1 and Origene1 antibodies perform well in detecting the endogenous expression of mTRPM8. To validate the specificity of these two antibodies, both ICC and IHC were repeated using DRG-cultured cells and slices from TRPM8 KO mice (*Trpm8*^{EGFPf}; B6;129S1(FVB)-*Trpm8*^{tm1Apat}/J) [25] that express farnesylated EGFP instead of TRPM8 (i.e., EGFP marks neurons that should have expressed TRPM8). Using either ECM1 or Origene1, specific antibody fluorescence was absent in the EGFP+ cells of the TRPM8 KO mouse (Figures 7 and S3). An unspecific signal was detected in some EGFP– cells (Figure 7A–D), albeit with a different fluorescence distribution and dimmer intensity than in EYFP+ cells in the TRPM8 reporter mouse (*Trpm8*^{BAC}-EYFP+) (Figure S3). Furthermore, the SR for both antibodies was significantly higher in the reporter mouse compared to the TRPM8 KO, both in ICC and IHC (Figure 7E,F).

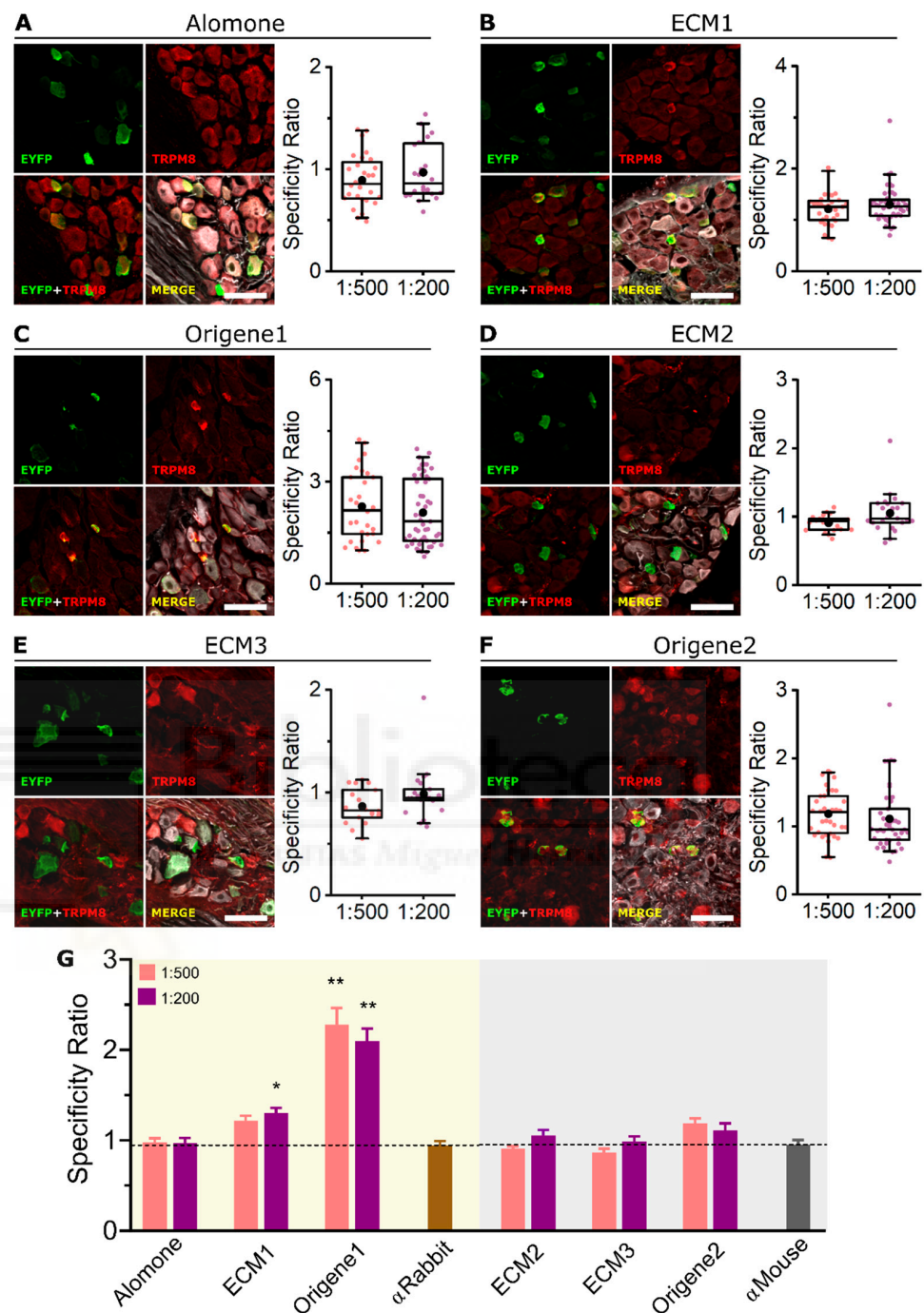


Figure 6. Immunohistochemistry of endogenous TRPM8 in DRG slices from the *Trpm8^{BAC}-EYFP⁺* mouse. (A–F left) Confocal images of TRPM8+ sensory neurons. EYFP (green), TRPM8 antibody (red) and β III-Tubulin (grey). Scale bar: 50 μ m. (A–F right) Box plots represent specificity ratio (SR) for each dilution of the respective antibody. Each dot corresponds to an individual EYFP+ cell. Box contains the 25th to 75th percentiles. Whiskers mark the 5th and 95th percentiles. The line inside the box denotes the median and the black dot represents the mean. (Differences among dilutions were not significant, Mann–Whitney test). (G) Bar histogram summarizing the SR mean $\pm$ SEM of each TRPM8 antibody and the controls without primary antibody (α Rabbit or α Mouse secondary antibodies alone). Dashed line indicates SR = 1. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Kruskal–Wallis followed by Dunn’s post hoc test vs. α Rabbit or α Mouse). n = at least 18 cells; 4 images from 2 mice for each antibody and dilution.

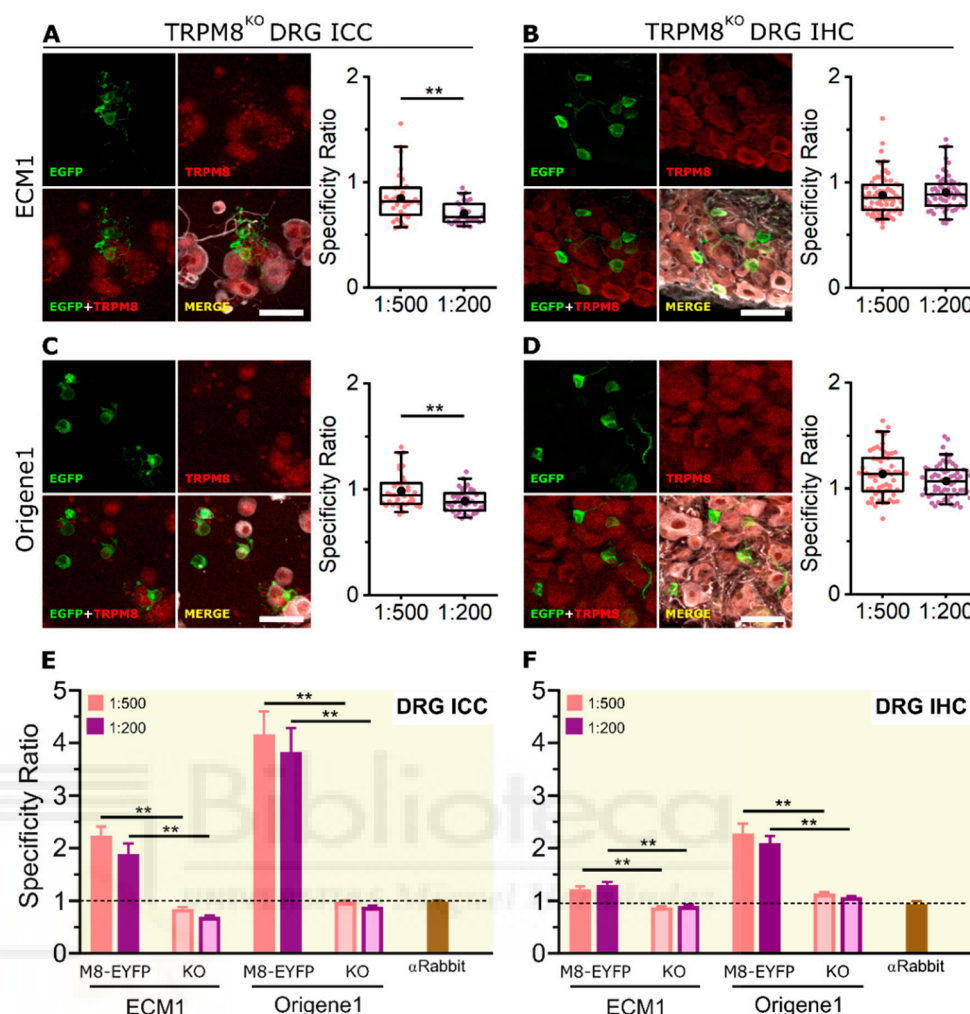


Figure 7. Immunofluorescence of endogenous TRPM8 in DRG cells and slices from the TRPM8 KO mouse. (A,C) Immunocytochemistry. (B,D) Immunohistochemistry. (A–D left) Confocal images of TRPM8 KO (*Trpm8*^{EGFPf}; B6;129S1(FVB)-*Trpm8*^{tm1Apat}/J) sensory neurons. EGFP (green), TRPM8 antibody (red) and βIII-Tubulin (grey). Scale bar: 50 μm. (A–D right) Box plots represent specificity ratio (SR) for each dilution of the respective antibody. Each dot corresponds to an individual EGFP+ cell. Box contains the 25th to 75th percentiles. Whiskers mark the 5th and 95th percentiles. The line inside the box denotes the median and the black dot represents the mean (** *p* < 0.01, Mann–Whitney test). (E,F) Bar histograms summarizing the SR mean ± SEM of each TRPM8 antibody in the KO and the reporter (*Trpm8*^{BAC-EYFP}, named M8-EYFP in the figure) mouse in ICC (E) and IHC (F). Dashed line indicates mean SR for the control without primary antibody (** *p* < 0.01, Mann–Whitney test). *n* = at least 22 cells; 4 pictures from 2 mice for each antibody and dilution.

3. Discussion

The use of antibodies to quantify the level or expression pattern of antigens (e.g., proteins) is one of the most popular and valuable techniques in cell biology. It is common knowledge that the performance of many antibodies is substandard, with low sensitivity and poor specificity [36]. Unfortunately, very often, negative results are not reported in the literature. In other cases, antibody specificity is not assessed critically, which could lead to the erroneous interpretation of the results. Thus, the proper characterization of antibodies is of utmost importance [36,37].

Our main aim was to compare the performance of six commercial TRPM8 antibodies in Western blot (WB), immunocytochemistry (ICC) and immunohistochemistry (IHC). Our results provide useful hints for choosing the most adequate antibodies for different

TRPM8 protein detection techniques. In our hands, the six antibodies analyzed show diverse suitability for each technique and expression system. According to the respective manufacturers, all six antibodies should work for WB. However, using their recommended dilutions, only three of them yielded satisfactory results for our standards. Interestingly, the Alomone antibody has been widely used for WB [38–40], but in our conditions, it did not work properly. However, in many of these articles, the antibody dilution was lower than recommended, and the reported TRPM8 bands were dubious and/or no full membrane/molecular weight markers were shown, making it difficult to rule out the presence of unspecific bands or cross-detection. In some cases, the reference to the antibody used was not clear; we could not rule out that it was a different antibody from the one we tested. Additionally, some studies targeted human TRPM8 [41,42], and we used the mouse ortholog instead. The Alomone antibody immunogen is publicly known (Table 2); it comprises 13 residues of human TRPM8, from which two are different in human and mouse. This may explain the discrepancy between the results of this work and what others reported with human TRPM8. ECM2 and ECM3 also failed to produce a good WB signal. In one of the replicates with ECM2, we detected a faint band of a molecular weight compatible with TRPM8, but it is also present in the lysate from non-transfected cells, thus questioning its specificity. Many other unspecific bands of different molecular weights were also detected (data not shown), so special caution has to be taken if using this antibody for WB. At the time of preparing this manuscript, to our knowledge, no published work references either ECM2 or ECM3 for WB. Interestingly, both ECM2 and ECM3, as well as Alomone, worked well in the ICC of mTRPM8 transfected HEK-293 cells, suggesting that they are in fact able to bind to mTRPM8. The discrepancy observed between WB and ICC could be explained by the fact that cell lysis and denaturing conditions used in WB may make the epitope less accessible to the antibody paratope. For those reasons, a potential use of these three antibodies for WB after improving conditions cannot be excluded.

ECM1, Origene1 and Origene2 produced consistently good results for WB and ICC in a TRPM8 overexpression system, indicating that, at least in the conditions of this study, they can be confidently used for both techniques. Limited literature references Origene1 [43]. No previous WB records have been found for ECM1 or Origene2, making this study the first to show their appropriateness for WB.

Proteins are differentially expressed in heterologous and endogenous systems, being generally more abundant in the former. Endogenous TRPM8 detection was more challenging, and only ECM1 and Origene1 worked well both in dorsal root ganglion (DRG) ICC and IHC. We cannot give a firm judgement about Origene2, as the immunostaining in DRG ICC was ambiguous. An additional consideration with Origene2 is that it was raised in mouse, and thus the anti-mouse secondary antibody could bind to immunoglobulins present in the mouse DRG, distorting the interpretation of the results (Figure S2). Testing this antibody in human samples could help in resolving this issue. These results, together with its good performance in the WB and ICC of HEK-293 cells, suggest that Origene2 could potentially be a good antibody for endogenous TRPM8 detection after adjusting experimental protocols.

In our hands, Alomone, ECM2 and ECM3 did not have enough sensitivity and/or specificity to detect endogenous TRPM8, at least with the conventional conditions we used. There is abundant literature using Alomone antibody for the detection of endogenous TRPM8 by ICC and/or IHC in different tissues [39,44–48]. However, in many of the published figures, the staining pattern was not consistent with the known restricted expression of TRPM8 [31,49]. In many cases, all cells seem to be stained with fluorescence evenly spread across the entire cell. In contrast, the fluorescence we see with antibodies that we consider good (ECM1 and Origene1) is distributed in a punctate pattern (Figure S1). Moreover, in some studies, this antibody marks almost all cells subjected to immunocytochemistry. This is inconsistent with the known expression pattern of TRPM8 in DRG neurons, which is restricted to a small subpopulation of about 10–15 % cells. In light of our results, we believe that caution should be taken interpreting the immunofluorescence signal from those

studies. Similar to the reasons proposed for WB, we cannot exclude that this antibody could perform better in human tissue or in different experimental conditions.

Our data lead us to suggest the use of ECM1, Origene1 and Origene2 for WB and ECM1 and Origene1 for the immunohistochemistry of endogenous TRPM8. A brief comparison of the performance of the tested antibodies with the different methodologies is shown in Table 1.

Table 1. Antibody performance with the different techniques used in this study. – poor, + regular, ++ good, +++ excellent.

Antibody	Host	HEK-293 + TRPM8-EYFP		Mouse DRG	
		WB	ICC	ICC	IHC
Alomone	Rabbit	–	++	–	–
ECM1	Rabbit	+++	+++	++	++
Origene1	Rabbit	+++	+++	+++	+++
ECM2	Mouse	–	++	–	–
ECM3	Mouse	–	++	–	–
Origene2	Mouse	+++	++	+	–

Origene1 has been discontinued. According to the available information, it seems to come from the same clone (EPR4196(2)) as Abcam ab109308 (also discontinued) that has been used with good results for WB and IHC [49–51]. We think that Abcam antibody could still be available in many labs and could be a good alternative for TRPM8 detection.

Limitations of the Study

Variations in immunodetection protocols result in countless procedures in the literature. The variables include fixation, sample preparation and tissue processing, antibody concentration, antigen retrieval, permeabilization, the blocking of non-specific sites, signal amplification, detection method and others [52]. There is no generic protocol for immunolabeling. We standardized the labeling procedure for the six antibodies tested but did not perform an in-depth exploration of the protocol space. It is perfectly feasible that other conditions would have resulted in better results with some of the antibodies tested. Various online resources provide useful tips on step-by-step guides for staining optimization.

4. Materials and Methods

4.1. Animals

All experimental procedures were performed in accordance with the Spanish Royal Decree 53/2013 and the European Community Council Directive 2010/63/EU. Adult mice (2–4 months old) of either sex were used. The mice were housed in a temperature-controlled room (21 °C) on a 12 h light/dark cycle, with access to food and water ad libitum.

Mouse Lines

Trpm8^{BAC}-EYFP⁺ BAC transgenic line was generated in our laboratory: enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) is expressed under the promoter of TRPM8 [33].

Trpm8^{EGFPf}; B6;129S1(FVB)-*Trpm8*^{tm1Apat}/J was obtained from Ardem Patapoutian (Scripps Research Institute) and expresses enhanced green fluorescent protein (EGFP) after the TRPM8 start codon; homozygous mice are null for TRPM8 [25]. The lox-P flanked neomycin cassette introduced in the *Trpm8* locus during the generation of the transgene was removed to enhance GFP expression [53]. The genotype of all mice was confirmed by PCR.

4.2. Cell Line Culture and Transfection

The HEK-293 cell line was obtained from ECACC (Salisbury, UK). Cells were maintained at 37 °C, 5% CO₂ in DMEM medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin. Twenty-four hours before transfection, the cells were seeded on 6-well plates. For ICC, the wells were filled with poly-L-lysine (0.01%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) treated 6 mm diameter #0 glass coverslips. The cells were transfected with mTRPM8-EYFP (mTRPM8 fused with EYFP at its C-terminus) [54] using a Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). In total, 3 µg DNA and 3 µL Lipofectamine in 300 µL Optimem (Thermo Fisher Scientific) were used per well containing 700 µL DMEM. Then, 24–48 h post-transfection, mTRPM8-EYFP expression was monitored with an epifluorescence microscope, and the cells were either lysated (for WB) or fixed in 4% PFA (for ICC).

4.3. Mouse DRG Extraction and Neuronal Culture

Mouse DRG neurons were extracted and dissociated as previously described [55]. Briefly, the mice were euthanized by cervical dislocation. The spinal cord was removed and 20–40 DRGs were dissected and washed in cold HBSS solution (Thermo Fisher Scientific). For IHC, whole ganglia were directly fixed for 2 h in 4 % PFA. For ICC, ganglia were then incubated in 900 U/mL type XI collagenase (Sigma-Aldrich) and 5.46 U/mL dispase (Thermo Fisher Scientific) for 45 min at 37 °C in 5% CO₂. After enzymatic treatment, the ganglia were mechanically dissociated using fire-polished glass pipettes in calcium-free solution containing HBSS (Thermo Fisher Scientific), 1% MEM-Vit (Thermo Fisher Scientific), 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific) and 100 mg/mL penicillin/streptomycin. The cell suspension was centrifuged, and the pellet was resuspended in culture medium containing: MEM (Thermo Fisher Scientific), 1% MEM-Vit (Thermo Fisher Scientific), 10% fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific) and 100 mg/mL penicillin/streptomycin. The cells were then seeded onto 6 mm diameter glass coverslips previously coated with 0.01% poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, St. Louis). Twenty-four hours after seeding, the cells were subjected to calcium imaging or fixed for 10 min in 4%PFA.

4.4. Calcium Microfluorometry

A Fura2-AM calcium indicator (Thermo Fisher Scientific) was used for ratiometric calcium imaging experiments. The cells were loaded with 5 µM Fura2-AM and 400 ng/mL Pluronic F-127 (Thermo Fisher Scientific) in control external solution for 45 min at 37 °C in 5% CO₂. The coverslips containing the cells were placed in a low volume chamber mounted on an inverted microscope (Leica DMI3000B, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and continuously perfused with fresh solution at a rate of ~1ml/min. The Fura2-AM was excited at 340 and 380 nm with a Lambda 10-2 filter wheel and a Lambda LS xenon arc lamp (Sutter Instruments, Novato, CA, USA). Emission fluorescence was filtered with a 510 nm long-pass filter. Images were acquired with an Orca ER CCD camera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) at a frequency of 0.33 Hz and analyzed with MetaFluor software (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). Cytosolic calcium increases are presented as the ratio of emission intensities after sequential excitation at 340 and 380 nm (F340/F380). Measurements of the HEK293-cells and DRG neurons were performed at 32–34 °C using a homemade water-cooled Peltier system controlled by a temperature feedback device.

4.5. Western Blot

All WB experiments were performed on samples obtained from HEK-293 cells transfected with mTRPM8-EYFP. The cells were harvested 48 h after transfection, centrifuged at 800× g 10 min and washed with cold PBS twice. The pellets were lysed (Buffer Lysis: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 120 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 % Nonidet P-40 with phosphatase, and protease inhibitors (cOmplete Mini, Roche)). The cell lysates were sonicated for 10 min at 4 °C and centrifuged at 10,000× g for 15 min at 4 °C. The protein amount was quantified (Pierce TM BCA Protein Assay Kit, (Thermo Fisher Scientific), and the samples

were diluted with loading buffer (10% sodium dodecyl sulfate, 312.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 50% glycerol and 0.05% bromophenol blue). The protein samples were subjected to SDS-PAGE (15 µg per lane) and blotted onto Protran Nitrocellulose Membrane—Whatman (GE Healthcare Life Science, Chicago, IL, USA). The membranes were blocked with blocking solution (5% powdered milk in TBST: Tris-buffered saline with 0.05% Tween-20) and incubated overnight at 4 °C with the respective anti-TRPM8 primary antibodies (see Table 1). Subsequently, membranes were washed with TBST, incubated with horseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody and developed with ECLplus (Thermo Fisher Scientific) and imaged in an Amersham Imager 680 device. After several washes with TBST, membranes were incubated overnight at 4 °C with anti-GFP (1:1000) and anti-GAPDH (1:5000) antibodies, developed and imaged as explained before.

4.6. Immunocytochemistry

Cells, cultured on coverslips, were fixed 10 min in 4% PFA in 0.1M PBS, washed three times in PBS and twice in TTBS (0.5 M Tris Base, 9% w/v NaCl, 0.5% Tween 20, pH 7.6) for 10 min. Non-specific binding sites were blocked by incubating the cells for 30 min in freshly prepared blocking solution (1X TTBS, 1% bovine serum albumin (Tocris Bioscience, Bristol, UK) and 0.25% Triton-X100). The cells were then incubated for 2 h at RT with the primary antibodies. Afterwards, the cells were washed three times with TTBS 10 min and incubated for 45 min at RT with the secondary antibodies. Both the primary and secondary antibodies were diluted in blocking solution. The cells were washed again three times with TTBS. An extra step was added for HEK cells that were incubated for 5 min in Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific). Then, the cells were washed with PBS and once with ddH₂O and mounted on a microscope slide using a VectaShield H-1000 antifade mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Mounted coverslips were sealed with clear nail polish and stored at 4 °C until imaging. Z-stack images with a step size of ~ 2 µm were acquired with an UPlanApo 20× or a PlanApoN 60× objective using an inverted confocal microscope (Olympus FV1200) driven by FV10-ASW 4.2 software (Olympus Life Sciences, Waltham, MA, USA).

4.7. Immunohistochemistry

Whole DRGs were fixed for 1 h in 4% PFA in 0.1 M PBS, washed twice in PBS for 10 min and cryoprotected in 30% sucrose overnight at 4 °C. The next day, tissue was embedded in an optimal cutting temperature compound (OCT Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) and frozen in dry ice. Then, 20 µm slices were cut using an MNT cryostat (Slee Medical, Nieder-Olm, Germany) and placed on SuperFrost microscope slides (Thermo Fisher Scientific). The slides were dried in an oven at 37 °C for 30 min and washed twice with PBT (0.1 M PB, 0.05% Tween20, pH 7.4). Antigen retrieval (when used) was performed by boiling the samples in pH 6.0 citrate buffer for 20 min using a water bath and letting them cool down in the bath for 10 min. Non-specific binding sites were blocked for 1 h with a blocking solution containing 5% bovine serum albumin and 1% Triton X-100 in PBT. The slides were incubated with the primary antibodies overnight at 4 °C. The next day, the slides were washed four times with PBT 10 min each and incubated with the secondary antibodies for 2h at RT. Both the primary and secondary antibodies were diluted as shown in Table 2 in blocking solution. Then, the slides were washed four times with PBT 10 min, once with PBS for 10 min and once with ddH₂O for 5 min. Finally, the slides were dried in dark conditions at RT, and a glass coverslip was mounted on top of each slide using Fluoromount mounting medium (Sigma-Aldrich). Z-stack images with a step size of ~2 µm were acquired with an UPlanApo 20× or a PlanApoN 60x objective using an inverted confocal microscope (Olympus FV1200) driven by FV10-ASW 4.2 software (Olympus Life Sciences).

4.8. Image Analysis and Quantification

All quantitative measurements were performed using the 16-bit raw maximum projection images without any further modification. We defined the antibody specificity ratio (SR) in a TRPM8+ cell as the mean signal intensity of the antibody fluorescence in that cell divided by the average of the mean signal intensity in several (at least 20) TRPM8− cells in the same field. An SR value of 1 indicates the same antibody fluorescence intensity in TRPM8+ and TRPM8− cells, while an SR > 1 indicates higher fluorescence intensity in TRPM8+ than in TRPM8− cells. TRPM8+ cells were identified by EYFP immunofluorescence, either in transfected cells or using a reporter mouse line. The images were analyzed with ImageJ 1.51j8 (NIH, Bethesda, MD, USA) and Origin 2019 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

4.9. Image Display

The immunofluorescence image brightness and contrast were only adjusted for image presentation to enhance visualization without altering any other feature. In the case of the TRPM8 antibody signal images, the maximum red pseudocolor level was set for the maximum fluorescence intensity; thus, images displaying high background noise correspond to experiments in which the antibody signal was poor.

4.10. Statistical Analysis

The values are given as indicated in each figure caption. The normality of data distribution was checked with Shapiro–Wilk and Kolmogorov–Smirnov tests. Statistical significance was estimated with the Mann–Whitney test or Kruskal–Wallis followed by Dunn’s post hoc test. A p -value < 0.05 was considered statistically significant. In the case of small samples ($n < 100$), the significance was curtailed to * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. The analysis was performed using Prism version 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4.11. Antibodies Used in This Study

All primary and secondary antibodies used are summarized in Table 2.

Table 2. Antibodies used in this study.

Target	Name in This Study	Company	Ref.	Species	Use	Immunogen	Dilutions Used
TRPM8	Alomone	Alomone	ACC-049	Rabbit	Primary	Human TRPM8 917–929. Polyclonal	1:200 (WB, ICC, ICH) 1:500 (ICC, ICH)
TRPM8	ECM1	ECM biosciences	TP5701	Rabbit	Primary	Human TRPM8 extracellular domain. Polyclonal	1:200 (ICC, ICH) 1:500 (WB, ICC, ICH)
TRPM8	ECM2	ECM biosciences	TM5711	Mouse	Primary	Human TRPM8 extracellular domain. Monoclonal	1:200 (ICC, ICH) 1:500 (WB, ICC, ICH)
TRPM8	ECM3	ECM biosciences	TM5721	Mouse	Primary	Human TRPM8 extracellular domain. Monoclonal	1:200 (ICC, ICH) 1:500 (WB, ICC, ICH)

Table 2. Cont.

Target	Name in This Study	Company	Ref.	Species	Use	Immunogen	Dilutions Used
TRPM8	Origene1	OriGene	TA307827	Rabbit	Primary	Human TRPM8 extracellular domain. Monoclonal	1:200 (ICC, ICH) 1:500 (WB, ICC, ICH)
TRPM8	Origene2	OriGene	TA811228	Mouse	Primary	Human 1–300. Monoclonal	1:200 (ICC, ICH) 1:500 (WB, ICC, ICH)
GFP/YFP	EYFP	Abcam	ab13970	Chicken	Primary	GFP. Polyclonal	1:2000 (ICC, IHC)
GFP/YFP	EGFP	Invitrogen	A6455	Rabbit	Primary	Isolated directly from Jellyfish Aequorea Victoria Polyclonal	1:1000 (WB)
Class III β -tubulin	β III tub-M	Biolegend	801201	Mouse	Primary	Rat brain microtubules. Monoclonal	1:1000 (ICC, IHC)
Class III β -tubulin	β III tub-R	Biolegend	802001	Rabbit	Primary	Rat brain microtubules. Polyclonal	1:1000 (ICC, IHC)
GAPDH	GAPDH	Sigma	G9545	Rabbit	Primary	Synthetic peptide: residues 314–333 of mouse GAPDH	1:5000 (WB)
Mouse	Mouse HRP	Sigma	A9044	Rabbit	Secondary-HRP	Rabbit IgG fraction antiserum	1:4000 (WB)
Mouse	MouseA598	Invitrogen	A11005	Goat	Secondary-Alexa598	Mouse gamma globulin heavy and light chains	1:1000 (ICC, IHC)
Mouse	MouseA647	Invitrogen	A21237	Goat	Secondary-Alexa647	Mouse gamma globulin heavy and light chains	1:1000 (ICC, IHC)
Chicken	ChickenA488	Jackson IR	703-545-155	Donkey	Secondary-Alexa488	Chicken gamma globulin	1:1000 (ICC, IHC)
Rabbit	Rabbit HRP	Sigma	A9169	Goat	Secondary-HRP	Goat IgG	1:4000 (WB)
Rabbit	RabbitA555	Abcam	ab150062	Donkey	Secondary-Alexa555	N/A	1:1000 (ICC, IHC)

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232416164/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, J.F.-T., E.d.l.P. and P.H.-O.; methodology, P.H.-O., R.T.-M., E.d.l.P. and J.F.-T.; validation, J.F.-T.; formal analysis, P.H.-O. and J.F.-T.; investigation, P.H.-O., R.T.-M., E.d.l.P. and J.F.-T.; resources, E.d.l.P. and F.V.; data curation, P.H.-O., E.d.l.P. and J.F.-T.; writing—original draft preparation, J.F.-T.; writing—review and editing, J.F.-T., F.V., P.H.-O. and E.d.l.P.; visualization, P.H.-O.; supervision, J.F.-T., E.d.l.P. and F.V.; project administration, J.F.-T.; funding acquisition, F.V. and E.d.l.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: During the course of this work, PH was supported by an FPI predoctoral fellowship (BES-2017-080782). This study was funded by MICIN/AEI/10.13039/501100011033 (PID2019-108194RB-I00), Generalitat Valenciana (PROMETEO/2021/031) and the Severo Ochoa Programme for Centres of Excellence in R&D (ref. SEV-2017-0723).

Institutional Review Board Statement: All experimental procedures abide by the Spanish Royal Decree 53/2013 and the European Community Council directive 2016/63/EU, regulating the use of animals in research. The Committee on Animal Research at the University Miguel Hernández approved all the animal procedures.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available from the authors on reasonable request.

Acknowledgments: We thank Ana Gomis for general support and the supply of various reagents, antibodies and lab equipment. We thank all members of the Sensory Transduction and Nociception Group (www.painchannels.com accessed on 15 December 2022) for insightful discussions. We thank Ardem Patapoutian (Scripps Research Institute) and Ajay Dhaka (University of Washington) for providing *Trpm8^{EGFPf}; B6;129S1(FVB)-Trpm8^{tm1Apat}/J* knockout mouse line. The authors are grateful to Eva Quintero for excellent technical assistance and to Cristina Cahiz and Pablo Llorca for helping with some experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Peier, A.M.; Moqrich, A.; Hergarden, A.C.; Reeve, A.J.; Andersson, D.A.; Story, G.M.; Earley, T.J.; Dragoni, I.; McIntyre, P.; Bevan, S.; et al. A TRP Channel That Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell* **2002**, *108*, 705–715. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Voets, T.; Owsianik, G.; Nilius, B. TRPM8. In *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*; Handbook of Experimental Pharmacology; Flockerzi, V., Nilius, B., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2007; Volume 179, pp. 329–344. ISBN 978-3-540-34889-4.
3. Sherkhelli, M.A.; Gisselmann, G.; Vogt-Eisele, A.K.; Doerner, J.F.; Hatt, H. Menthol Derivative WS-12 Selectively Activates Transient Receptor Potential Melastatin-8 (TRPM8) Ion Channels. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2008**, *21*, 370–378.
4. Almaraz, L.; Manenschijn, J.-A.; de la Peña, E.; Viana, F. TRPM8. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2014**, *222*, 547–579. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. McKemy, D.D.; Neuhauser, W.M.; Julius, D. Identification of a Cold Receptor Reveals a General Role for TRP Channels in Thermosensation. *Nature* **2002**, *416*, 52–58. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Qin, F. Regulation of TRP Ion Channels by Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2007**, *179*, 509–525. [\[CrossRef\]](#)
7. Rohács, T.; Lopes, C.M.B.; Michailidis, I.; Logothetis, D.E. PI(4,5)P₂ Regulates the Activation and Desensitization of TRPM8 Channels through the TRP Domain. *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 626–634. [\[CrossRef\]](#)
8. Vriens, J.; Nilius, B.; Voets, T. Peripheral Thermosensation in Mammals. *Nat. Rev. Neurosci.* **2014**, *15*, 573–589. [\[CrossRef\]](#)
9. Parra, A.; Madrid, R.; Echevarria, D.; del Olmo, S.; Morenilla-Palao, C.; Acosta, M.C.; Gallar, J.; Dhaka, A.; Viana, F.; Belmonte, C. Ocular Surface Wetness Is Regulated by TRPM8-Dependent Cold Thermoreceptors of the Cornea. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 1396–1399. [\[CrossRef\]](#)
10. Robbins, A.; Kurose, M.; Winterson, B.J.; Meng, I.D. Menthol Activation of Corneal Cool Cells Induces TRPM8-Mediated Lacrimation but Not Nociceptive Responses in Rodents. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2012**, *53*, 7034. [\[CrossRef\]](#)
11. Quallo, T.; Vastani, N.; Horridge, E.; Gentry, C.; Parra, A.; Moss, S.; Viana, F.; Belmonte, C.; Andersson, D.A.; Bevan, S. TRPM8 Is a Neuronal Osmosensor That Regulates Eye Blinking in Mice. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7150. [\[CrossRef\]](#)
12. Belmonte, C.; Gallar, J. Cold Thermoreceptors, Unexpected Players in Tear Production and Ocular Dryness Sensations. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2011**, *52*, 3888. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Belmonte, C.; Nichols, J.J.; Cox, S.M.; Brock, J.A.; Begley, C.G.; Bereiter, D.A.; Dartt, D.A.; Galor, A.; Hamrah, P.; Ivanusic, J.J.; et al. TFOS DEWS II Pain and Sensation Report. *Ocul. Surf.* **2017**, *15*, 404–437. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

14. Ma, S.; Yu, H.; Zhao, Z.; Luo, Z.; Chen, J.; Ni, Y.; Jin, R.; Ma, L.; Wang, P.; Zhu, Z.; et al. Activation of the Cold-Sensing TRPM8 Channel Triggers UCP1-Dependent Thermogenesis and Prevents Obesity. *J. Mol. Cell Biol.* **2012**, *4*, 88–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Henström, M.; Hadizadeh, F.; Beyder, A.; Bonfiglio, F.; Zheng, T.; Assadi, G.; Rafter, J.; Bujanda, L.; Agreus, L.; Andreasson, A.; et al. TRPM8 Polymorphisms Associated with Increased Risk of IBS-C and IBS-M. *Gut* **2017**, *66*, 1725–1727. [[CrossRef](#)]
16. Hosoya, T.; Matsumoto, K.; Tashima, K.; Nakamura, H.; Fujino, H.; Murayama, T.; Horie, S. TRPM8 Has a Key Role in Experimental Colitis-Induced Visceral Hyperalgesia in Mice. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* **2014**, *26*, 1112–1121. [[CrossRef](#)]
17. Ramachandran, R.; Hyun, E.; Zhao, L.; Lapointe, T.K.; Chapman, K.; Hirota, C.L.; Ghosh, S.; McKemy, D.D.; Vergnolle, N.; Beck, P.L.; et al. TRPM8 Activation Attenuates Inflammatory Responses in Mouse Models of Colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 7476–7481. [[CrossRef](#)]
18. Gardiner, J.C.; Kirkup, A.J.; Curry, J.; Humphreys, S.; O'Regan, P.; Postlethwaite, M.; Young, K.C.; Kitching, L.; Ethell, B.T.; Winpenny, D.; et al. The Role of TRPM8 in the Guinea-Pig Bladder-Cooling Reflex Investigated Using a Novel TRPM8 Antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *740*, 398–409. [[CrossRef](#)]
19. Uvin, P.; Franken, J.; Pinto, S.; Rietjens, R.; Grammet, L.; Deruyver, Y.; Alpizar, Y.A.; Talavera, K.; Vennekens, R.; Everaerts, W.; et al. Essential Role of Transient Receptor Potential M8 (TRPM8) in a Model of Acute Cold-Induced Urinary Urgency. *Eur. Urol.* **2015**, *68*, 655–661. [[CrossRef](#)]
20. Andersson, K.-E.; Gratzke, C.; Hedlund, P. The Role of the Transient Receptor Potential (TRP) Superfamily of Cation-Selective Channels in the Management of the Overactive Bladder. *BJU Int.* **2010**, *106*, 1114–1127. [[CrossRef](#)]
21. Mukerji, G.; Yiangou, Y.; Corcoran, S.L.; Selmer, I.S.; Smith, G.D.; Benham, C.D.; Bountra, C.; Agarwal, S.K.; Anand, P. Cool and Menthol Receptor TRPM8 in Human Urinary Bladder Disorders and Clinical Correlations. *BMC Urol.* **2006**, *6*, 6. [[CrossRef](#)]
22. Ordás, P.; Hernández-Ortego, P.; Vara, H.; Fernández-Peña, C.; Reimúndez, A.; Morenilla-Palao, C.; Guadaño-Ferraz, A.; Gomis, A.; Hoon, M.; Viana, F.; et al. Expression of the Cold Thermoreceptor TRPM8 in Rodent Brain Thermoregulatory Circuits. *J. Comp. Neurol.* **2021**, *529*, 234–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Reimúndez, A.; Fernández-Peña, C.; Ordás, P.; Hernández-Ortego, P.; Gallego, R.; Morenilla-Palao, C.; Navarro, J.; Martín-Cora, F.; Pardo-Vázquez, J.L.; Schwarz, L.A.; et al. The Cold-Sensing Ion Channel TRPM8 Regulates Central and Peripheral Clockwork and the Circadian Oscillations of Body Temperature. *Acta Physiol.* **2022**, e13896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Valero, M.; Morenilla-Palao, C.; Belmonte, C.; Viana, F. Pharmacological and Functional Properties of TRPM8 Channels in Prostate Tumor Cells. *Pflugers Arch.* **2011**, *461*, 99–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Dhaka, A.; Murray, A.N.; Mathur, J.; Earley, T.J.; Petrus, M.J.; Patapoutian, A. TRPM8 Is Required for Cold Sensation in Mice. *Neuron* **2007**, *54*, 371–378. [[CrossRef](#)]
26. Takashima, Y.; Daniels, R.L.; Knowlton, W.; Teng, J.; Liman, E.R.; McKemy, D.D. Diversity in the Neural Circuitry of Cold Sensing Revealed by Genetic Axonal Labeling of Transient Receptor Potential Melastatin 8 Neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2007**, *27*, 14147–14157. [[CrossRef](#)]
27. Kobayashi, K.; Fukuoka, T.; Obata, K.; Yamanaka, H.; Dai, Y.; Tokunaga, A.; Noguchi, K. Distinct Expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in Rat Primary Afferent Neurons with A δ /c-Fibers and Colocalization with Trk Receptors. *J. Comp. Neurol.* **2005**, *493*, 596–606. [[CrossRef](#)]
28. Meissner, M.; Obmann, V.C.; Hoshcke, M.; Link, S.; Jung, M.; Held, G.; Philipp, S.E.; Zimmermann, R.; Flockerzi, V. Lessons of Studying TRP Channels with Antibodies. In *TRP Channels*; Zhu, M.X., Ed.; CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, FL, USA, 2011; ISBN 978-1-4398-1860-2.
29. Jemal, I.; Soriano, S.; Conte, A.L.; Morenilla, C.; Gomis, A. G Protein-Coupled Receptor Signalling Potentiates the Osmo-Mechanical Activation of TRPC5 Channels. *Pflugers Arch.* **2014**, *466*, 1635–1646. [[CrossRef](#)]
30. Veliz, L.A.; Toro, C.A.; Vivar, J.P.; Arias, L.A.; Villegas, J.; Castro, M.A.; Brauchi, S. Near-Membrane Dynamics and Capture of TRPM8 Channels within Transient Confinement Domains. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13290. [[CrossRef](#)]
31. Ghosh, D.; Pinto, S.; Danglot, L.; Vandewauw, I.; Segal, A.; Van Ranst, N.; Benoit, M.; Janssens, A.; Vennekens, R.; Vanden Berghe, P.; et al. VAMP7 Regulates Constitutive Membrane Incorporation of the Cold-Activated Channel TRPM8. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10489. [[CrossRef](#)]
32. Rivera, B.; Moreno, C.; Lavanderos, B.; Hwang, J.Y.; Fernández-Trillo, J.; Park, K.S.; Orio, P.; Viana, F.; Madrid, R.; Pertusa, M. Constitutive Phosphorylation as a Key Regulator of Trpm8 Channel Function. *J. Neurosci.* **2021**, *41*, 8475–8493. [[CrossRef](#)]
33. Morenilla-Palao, C.; Luis, E.; Fernández-Peña, C.; Quintero, E.; Weaver, J.L.; Bayliss, D.A.; Viana, F. Ion Channel Profile of TRPM8 Cold Receptors Reveals a Role of TASK-3 Potassium Channels in Thermosensation. *Cell Rep.* **2014**, *8*, 1571–1582. [[CrossRef](#)]
34. Cattoretti, G.; Pileri, S.; Parravicini, C.; Becker, M.H.; Poggi, S.; Bifulco, C.; Key, G.; D'Amato, L.; Sabattini, E.; Feudale, E. Antigen Unmasking on Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Sections. *J. Pathol.* **1993**, *171*, 83–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Krenacs, L.; Krenacs, T.; Stelkovich, E.; Raffeld, M. Heat-Induced Antigen Retrieval for Immunohistochemical Reactions in Routinely Processed Paraffin Sections. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2010**, *588*, 103–119. [[CrossRef](#)]
36. Bordeaux, J.; Welsh, A.W.; Agarwal, S.; Killiam, E.; Baquero, M.T.; Hanna, J.A.; Anagnostou, V.K.; Rimm, D.L. Antibody Validation. *BioTechniques* **2010**, *48*, 197–209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Burry, R.W. Controls for Immunocytochemistry: An Update. *J. Histochem. Cytochem.* **2011**, *59*, 6–12. [[CrossRef](#)]
38. Möller, M.; Möser, C.V.; Weiß, U.; Niederberger, E. The Role of AlphaSynuclein in Mouse Models of Acute, Inflammatory and Neuropathic Pain. *Cells* **2022**, *11*, 1967. [[CrossRef](#)]

39. Genovesi, S.; Moro, R.; Vignoli, B.; De Felice, D.; Canossa, M.; Montironi, R.; Carbone, F.G.; Barbareschi, M.; Lunardi, A.; Alaimo, A. Trpm8 Expression in Human and Mouse Castration Resistant Prostate Adenocarcinoma Paves the Way for the Preclinical Development of TRPM8-Based Targeted Therapies. *Biomolecules* **2022**, *12*, 193. [\[CrossRef\]](#)
40. Thapa, D.; Barrett, B.; Argunhan, F.; Brain, S.D. Influence of Cold-TRP Receptors on Cold-Influenced Behaviour. *Pharmaceuticals* **2021**, *15*, 42. [\[CrossRef\]](#)
41. Vinuela-Fernandez, I.; Sun, L.; Jerina, H.; Curtis, J.; Allchorne, A.; Gooding, H.; Rosie, R.; Holland, P.; Tas, B.; Mitchell, R.; et al. The TRPM8 Channel Forms a Complex with the 5-HT1B Receptor and Phospholipase D That Amplifies Its Reversal of Pain Hypersensitivity. *Neuropharmacology* **2014**, *79*, 136–151. [\[CrossRef\]](#)
42. Gkika, D.; Lemonnier, L.; Shapovalov, G.; Gordienko, D.; Poux, C.; Bernardini, M.; Bokhobza, A.; Bidaux, G.; Degerny, C.; Verreman, K.; et al. TRP Channel-Associated Factors Are a Novel Protein Family That Regulates TRPM8 Trafficking and Activity. *J. Cell Biol.* **2015**, *208*, 89–107. [\[CrossRef\]](#)
43. Yudin, Y.; Lutz, B.; Tao, Y.-X.; Rohacs, T. Phospholipase C $\Delta 4$ Regulates Cold Sensitivity in Mice. *J. Physiol.* **2016**, *594*, 3609–3628. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Chukyo, A.; Chiba, T.; Kambe, T.; Yamamoto, K.; Kawakami, K.; Taguchi, K.; Abe, K. Oxaliplatin-Induced Changes in Expression of Transient Receptor Potential Channels in the Dorsal Root Ganglion as a Neuropathic Mechanism for Cold Hypersensitivity. *Neuropeptides* **2018**, *67*, 95–101. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Villalba-Riquelme, E.; de la Torre-Martínez, R.; Fernández-Carvajal, A.; Ferrer-Montiel, A. Paclitaxel in Vitro Reversibly Sensitizes the Excitability of IB4(-) and IB4(+) Sensory Neurons from Male and Female Rats. *Br. J. Pharmacol.* **2022**, *179*, 3693–3710. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Acharya, T.K.; Kumar, S.; Tiwari, N.; Ghosh, A.; Tiwari, A.; Pal, S.; Majhi, R.K.; Kumar, A.; Das, R.; Singh, A.; et al. TRPM8 Channel Inhibitor-Encapsulated Hydrogel as a Tunable Surface for Bone Tissue Engineering. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 3730. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Lee, P.R.; Lee, J.Y.; Kim, H.B.; Lee, J.H.; Oh, S.B. TRPM8 Mediates Hyperosmotic Stimuli-Induced Nociception in Dental Afferents. *J. Dent. Res.* **2020**, *99*, 107–114. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Majhi, R.K.; Saha, S.; Kumar, A.; Ghosh, A.; Swain, N.; Goswami, L.; Mohapatra, P.; Maity, A.; Kumar Sahoo, V.; Kumar, A.; et al. Expression of Temperature-Sensitive Ion Channel TRPM8 in Sperm Cells Correlates with Vertebrate Evolution. *PeerJ* **2015**, *3*, e1310. [\[CrossRef\]](#)
49. Cornejo, V.H.; González, C.; Campos, M.; Vargas-Saturno, L.; de los Juricic, M.Á.; Miserey-Lenkei, S.; Pertusa, M.; Madrid, R.; Couve, A. Non-Conventional Axonal Organelles Control TRPM8 Ion Channel Trafficking and Peripheral Cold Sensing. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 4505–4517.e5. [\[CrossRef\]](#)
50. He, J.; Pham, T.L.; Kakazu, A.H.; Bazan, H.E.P. Remodeling of Substance P Sensory Nerves and Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) Cold Receptors After Corneal Experimental Surgery. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2019**, *60*, 2449. [\[CrossRef\]](#)
51. Borowiec, A.; Sion, B.; Chalmel, F.; Rolland, A.D.; Lemonnier, L.; De Clerck, T.; Bokhobza, A.; Derouiche, S.; Dewailly, E.; Slomianny, C.; et al. Cold/Menthol TRPM8 Receptors Initiate the Cold-shock Response and Protect Germ Cells from Cold-shock-Induced Oxidation. *FASEB J.* **2016**, *30*, 3155–3170. [\[CrossRef\]](#)
52. Ramos-Vara, J.A.; Miller, M.A. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry—The Red, Brown, and Blue Technique. *Vet. Pathol.* **2014**, *51*, 42–87. [\[CrossRef\]](#)
53. Dhaka, A.; Earley, T.J.; Watson, J.; Patapoutian, A. Visualizing Cold Spots: TRPM8-Expressing Sensory Neurons and Their Projections. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 566–575. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Pertusa, M.; González, A.; Hardy, P.; Madrid, R.; Viana, F. Bidirectional Modulation of Thermal and Chemical Sensitivity of TRPM8 Channels by the Initial Region of the N-Terminal Domain. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 21828–21843. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Caires, R.; Luis, E.; Taberner, F.J.; Fernandez-Ballester, G.; Ferrer-Montiel, A.; Balazs, E.A.; Gomis, A.; Belmonte, C.; De La Peña, E. Hyaluronan Modulates TRPV1 Channel Opening, Reducing Peripheral Nociceptor Activity and Pain. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8095. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

AGRADECIMIENTOS

El cordobés Lucio Séneca dice que "no hay camino fácil hacia las estrellas", y una buena tesis doctoral sobre el dolor no puede completarse sin experimentar una cierta dosis del mismo. Sin embargo, más allá del esfuerzo personal que he depositado en estas páginas, cada figura, cada gráfico y cada línea también reflejan el apoyo, la inspiración y la compañía de todas las personas que han estado a mi lado en este largo viaje, a las que quiero agradecer.

A Ana y Félix, mis directores, por permitirme iniciarme en el mundo científico y enseñarme todo lo que saben de él, pero especialmente, por transmitirme su filosofía de trabajo y de esfuerzo, que me llevo como máxima lección de esta tesis y como mejor herramienta para manejarme por el mundo.

A todos los que han aportado su esfuerzo y conocimiento para que este trabajo salga adelante: Elvira, Salva, Laura, Reme, Clara y Paco, por sus siempre útiles contribuciones en lo científico y a veces en lo personal, a Eva, Mireille y Ana Miralles, por su paciencia, disposición a ayudar y eterno buen rollo, y a Josemi, Puri, Aitana y Álex, por hacer más fácil el aterrizaje en Alicante.

A los compis de laboratorio, que, por la condición común de expatriados, se terminan constituyendo en la nueva familia: A Aída, catedrática de TRPA1, asados y mate. A Ana, siempre dispuesta a cualquier plan por tarde que sea. A Kat, mejor conocedora de la provincia y sus montañas que los propios alicantinos. A Chiara, revolución necesaria del laboratorio, energía pura y vitalidad contagiosa. A Espe, pragmática, realista e intuitiva como nadie. A Pancho, heredero natural del título de rey del cotilleo. A Sergio, capaz de montar un setup y disparar un arcabuz. A Manu, por mantener a esta caterva de carcamales informados de la actualidad. A Jorge, compañero de mesa, por esas largas y únicas conversaciones de los temas más variados y por su inestimable ayuda científica. A Khalid, compañero de trabajo, de piso, de equipo, por su generosidad y alegría, por convertirse en un hermano.

A la gente que ha contribuido a crear recuerdos inolvidables en Alicante y recordar esta etapa con enorme cariño, Aroa, Mercedes, Kevin, Sandra, Amr, Salma, Álvaro, Adri, Sergio(s), Lucía, Irene, Aida, Chrysa, Juan, Ernesto, Roberto(s) y tantos otros. A Javi, modelo a seguir. A Adri, compañero de dolores. A Raúl, instigador de la fiebre crossfitera. A Alberto, Selene y Taha, imposible encontrar mejores compañeros de piso.

A los que desde la distancia siempre estuvieron ahí: al Templo, que se mantiene pese al paso del tiempo. A los Nostálgicos, que nunca olvidan un cumpleaños y eso, en la distancia, se valora el

doble. A los del Máster, apoyo mutuo en un viaje común. A los berlangueses, leganeses y fuenlabradeses, por compartir tiempo de desconexión.

A mi familia, tíos, primos y abuelas, por darme una infancia feliz, por muy orgullosos que estén ellos de mí, más lo estaré yo siempre de ellos. A la familia de María, por hacer que me sienta desde el primer día como uno más.

A María, mi familia, que ha sufrido conmigo los peores momentos de la tesis y aún así me ha acompañado, consolado, escuchado, comprendido y animado en todo momento. Estas páginas llevan también su esfuerzo. Llegó el momento de volar alto, juntos.

A mi madre, que me ha dado todo lo que tiene y me ha hecho ser lo que soy. A mi hermano, al que admiro como si él fuera mi hermano mayor.

A mi padre, cuyo amor siempre está conmigo y sin el cual no habría llegado aquí. Gracias.

